193

Aus der Medizinischen Klinik der Martin Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. R. Cobet.

Ueber das Wesen der Oxydase- und Peroxydase-reaktion und ihr Verhalten bei Leukämien

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Martin Bösel

aus Halle a. d. Saale.

Halle/Saale
1939

Verlag Carl Nieft, Bleicherode am Harz

SAN FRANCISCO

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Grunke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Cobet

Tag der mündlichen Prüfung: 24. II. 1939

Gliederung.

Seite

Einleitung 5

I. Zur Frage der Leukozytengranulation 6

A. Leukozytengranula und ihre Beziehung zu den Farbstoffbildungen der Oxydationsreaktionen 6

B. Der chemische Aufbau der Leukozytengranula des Menschen und seine Erforschung durch verschiedene Methoden . . . 7

1. Indirekte Methoden 7

2. Direkte Methoden 8

3. Exogene Entstehung der Granula 10

C. Die eosinophile Granulation des Pferdes, ihr chemischer Aufbau und die in ihr vorkommenden Oxydationsfermente . . . 11

II. Oxydase- und Peroxydasereaktion und die sie bewirkenden Stoffe. 12

A. Fermenttheorie und Oxydase- und Peroxydasereaktion . . . 13

1. Einteilung der Fermente 13

2. Die Nadimethode und ihre Modifikationen, ihre Chemie und ihre Geschichte 15

3. Die Benzidin-Wasserstoffsuperoxydmethode und ihre Modifikationen, ihre Chemie und ihre Geschichte 16

4. Beeinflussung der Oxydase- und Peroxydasereaktion . . . 18

B. Autooxydation 19

C. Ionentheorie 19

D. Lipoidtheorie 21

E. Aldehydtheorie 22

III. Zentralnervöse Regulation des Blutbildes. Das striäre Blutsyndrom. 23

IV. Oxydase- und Peroxydasereaktion bei Leukämien 26

Schlußbetrachtung 33

Einleitung.

Durch die Färbemethode nach Pappenheim können im menschlichen Blutausstrich in den Zellen des myeloischen Systems, den Leukozyten, Körnelungen, sogenannte Granulationen, dargestellt werden. Nach ihrem färberischen Verhalten bezeichnet man sie als neutro-, baso- oder eosinophil. Diese granulierten Zellen haben die Fähigkeit zu Farbreaktionen, welche folgendermaßen vor sich gehen. Durch in den Zellen befindliche Stoffe, — bei der lebenden Zelle sollen sie für die innere Atmung von Bedeutung sein, — kommt es durch Oxydation von farblosen organischen Verbindungen zur Farbstoffbildung, die in Form von Körnelungen in den Zellen sichtbar wird. Dabei wird im allgemeinen angenommen, daß diese Farbgranula in Beziehung zu den spezifischen Granulis der Leukozyten stehen. Ob es sich bei der beschriebenen Reaktion um Fermentwirkungen handelt, wird im Laufe der Arbeit erörtert.

Gehen die Farbreaktionen ohne Sauerstoffzusatz vor sich, so spricht man von Oxydasemethoden. Bei den Peroxydasefärbungen ist ein Peroxyd zur Entstehung der Farbstoffbildung notwendig.

Die in der Hämatologie gebräuchliche Oxydasereaktion ist die alpha-Naphtol-Dimethylparaphenylendiamin-Farbreaktion, die sogenannte Nadi-Methode. Zur Darstellung der Peroxydasefermente sind im allgemeinen die Benzidin-Wasserstoffsuperoxyd-Methode und ihre Modifikationen üblich.

Es seien der einfacheren Bezeichnung halber in dieser Arbeit, wenn von Oxydase- und Peroxydasereaktion die Rede ist, immer diese bekannten beiden Methoden gemeint. Werden andere Verbindungen zum Nachweis oxydatischer Eigenschaften geschildert, so kommt dies auch in der Bezeichnung der Oxydationsreaktionen zum Ausdruck. Die Oxydase- und Peroxydasereaktion werden mit zur Unterscheidung der myeloischen gegen die lymphatische Leukämie angewandt. Dabei zeigt der Ausfall der Nadi- und Benzidinmethode an den weißen Blutzellen folgendes Ergebnis:

Von den granulierten Zellen sind die reifen neutro- und eosinophilen Formen immer positiv. Über den Ausfall der basophilen Zellen, die auch als Mastzellen bezeichnet werden, sind die Meinungen geteilt. Nach Naegeli reagieren die Zellen positiv, nach Ansicht japanischer Forscher sind sie zu 90% negativ.

Auch bei den Monozyten tritt Naegeli für den positiven Ausfall der Reaktion ein, während Schilling und Stockinger das Gegenteil behaupten.

Die Vorstufen der Neutro- und Eosinophilen — unreife basophile Zellen sind zu wenig beobachtet — d. h. Stabkernige, Metamyelozyten, Myelozyten und Promyelozyten, selbst die Myeloblasten z. T. reagieren positiv. Die ganz unreifen Myeloblasten, die besonders bei Leukämien vorkommen, sind jedoch negativ.

Die Lymphozyten reagieren immer negativ. Auf Grund dieser Tatsache können, wie schon erwähnt, die Farbreaktionen zur Differentialdiagnose der myeloischen gegen die lymphatische Leukämie verwendet werden.

Bisher wurde im allgemeinen angenommen, der Ausfall der Oxydasereaktion gehe dem der Peroxydasereaktion bezüglich des Quantitativen und Qualitativen völlig parallel. Die bis jetzt näher bekannten Unterschiede im Ausfall beider Methoden wurden meistens im Zusammenhang mit enzephalitischen Krankheitsprozessen beobachtet; ein besonderer Abschnitt der Arbeit setzt sich damit auseinander.

Doch auch sonst wurden in letzter Zeit von Forschern, die vergleichend beide Methoden, besonders bei Leukämien, nebeneinander anwandten, Zweifel laut, ob bei Anwendung der Peroxydasemethode genau das gleiche Ergebnis erzielt würde wie bei der Oxydasereaktion.

In der folgenden Arbeit, die auf Anregung von Herrn Prof. Grunke entstand, wurde versucht, an leukämischen Blutbildern die Frage zu klären, ob im prozentualen Ausfall der positiven Zellen bei der Oxydase- und Peroxydasereaktion ein Unterschied besteht.

Es lag im Wesen der Arbeit, auf die die Farbreaktionen gebenden Stoffe, wahrscheinlich Fermente, besonders einzugehen. Weiter wurde der chemische Aufbau der Leukozytengranulationen, die wahrscheinlich diese Stoffe enthalten, genauer besprochen.

I. Zur Frage der Leukozytengranulationen.

A. Leukozytengranula und ihre Beziehung zu den Farbstoffbildungen der Oxydationsreaktionen.

Nach Ansicht der meisten Forscher steht die Farbstoffbildung der Oxydase- und Peroxydasereaktion in irgendwelchen Beziehungen mit den durch die Pappenheimsche Färbemethode darstellbaren Granulationen der myeloischen Leukozyten.

Nach Hirschfeld (21) sind es die präformierten Granula der Zellen, die sich mit Indophenolblau und Benzidin färben. Dies beweisen die an tierischem Blut erzielten Ergebnisse, wie z. B. an den eosinophilen Granula des Pferdeblutes, die sich in Form und Größe ganz erheblich von den menschlichen Granula unterscheiden. Nach Hirschfeld gibt es keine selbständigen Oxydasegranula. Neumann (36; 37) führte die Nadimethode an den aus dem Zellverband isolierten eos. Granula des Pferdes aus und bewies damit, wenn auch nur für diesen speziellen Fall, die Identität der präformierten mit den histochemisch darstellbaren Zellkörnelungen.

Naegeli (34) sieht den Beweis, daß es tatsächlich die Granula sind, und nicht das zwischen ihnen gelegene Plasma, die sich mit Indophenolblau färben, darin, daß an Speichelkörperchen des Menschen mit tanzenden neutrophilen Granula, — ebenso bei Bronchialasthma an tanzenden eos. Körnchen — auf das allerdeutlichste die blauen Granula ihre lebhaften Bewegungen ausführen.

In jüngster Zeit (1934) stellte Solarino (61) an Hand eigener Untersuchungen, wobei er die Sato'sche Peroxydasereaktion anwandte und mit Giemsa nachfärbte, fest, daß die Peroxydasekörnelungen nichts mit den spezifischen, durch Giemsa darstellbaren Granula zu tun hätten. Beide Granulaarten seien deutlich zu unterscheiden. Verschiedene Forscher, die nach ähnlichen Methoden gearbeitet haben, wie Sato, Brinnitzer, Moschkowsky (siehe S. 17) und andere, haben nur erwähnt, daß bei Giemsa-Nachfärbung die Kerne deutlich und panoptisch dargestellt würden. Von neben den Peroxydasegranula vorhandenen Giemsakörnelungen ist niemals etwas berichtet worden.

B. Der chemische Aufbau der Leukozytengranula des Menschen und seine Erforschung durch verschiedene Methoden (nach Neumann).

Der chemische Aufbau der Leukozytengranula kann sowohl direkt, durch makro-, mikro- oder histochemische Untersuchungen, als auch indirekt durch histologische Färbungen und andere Methoden erforscht werden.

1. Indirekte Methoden.

Granulationen in Körperzellen sind sicher schon sehr bald nach der ersten Anwendung des Mikroskopes gesehen worden. Eine wirkliche Wissenschaft von den Körnelungen der weißen Blutzellen setzte jedoch erst in dem Augenblick ein, als Paul Ehrlich im Jahre 1879 seine erste Mitteilung über die spezifischen Granulationen des Blutes veröffentlichte.

Die histologische Differenzierung der Leukozytengranula nach diesem Forscher beruht darauf, daß die einzelnen Granula nicht nur im Nativpräparat von einander durch ihre Form und durch ihr Aussehen unterscheidbar sind, sondern daß sie auch eine ganz bestimmte, und zwar verschiedene Affinität zu basischen und sauren Farbstoffen besitzen.

Ehrlich hat die Meinung vertreten, daß die Farbreaktion auch zugleich eine chemische Reaktion zwischen dem Farbstoff und dem zu färbenden Substrat ist. Wobei bei der Anfärbbarkeit mit sauren Farbstoffen ein basischer Körper, z. B. Eiweiß, vorhanden sein muß. Entsprechend ist die Färbung mit basischen Farbstoffen zu deuten. Andere Forscher sind der Meinung, daß der Ausfall der Färbung ein chemisch-physikalisches Problem ist, bei welchem nicht die chemische Beschaffenheit der aufeinander wirkenden Stoffe, sondern elektrische Ladungen eine Rolle spielen.

Naegeli, der in der Hauptsache zwar ein Anhänger der chemischen Theorie der Färbung ist, und hier das elektive Vermögen gewisser Zellelemente zur Entnahme von bestimmten Farbstoffen aus einem Gemisch hervorhebt, vermeidet doch eine feste Stellungnahme. Seiner Ansicht nach ist die Farbreaktion nebensächlich, wichtiger ist das sonstige morphologische Aussehen, die Kernbeschaffenheit usw. (36; 37).

In ein neues Licht wird die Frage der Farbstoffaffinität der Granula durch die Ergebnisse der Untersuchungen von Mommsen (32) gerückt. Er zeigt, welch wichtige Rolle der Ph-Wert der Fixierungs- oder Färbeflüssigkeiten bei der Darstellung der Leukozytengranula spielt. Durch systematische Untersuchungen von Blutausstrichen in Farblösungen, die durch Zusatz von Puffersubstanzen eine meßbare Ph-Konzentration hatten, stellte sich folgendes heraus: Es kann prinzipiell jeder Zellteil mit saurem und basischem Farbstoff dargestellt werden. Die Begriffe Azidophilie und Basophilie gelten nur für einen bestimmten Ph-Bereich. In der Ph-Zone der Umfärbung liegt der isoelektrische Punkt des betreffenden Zellteils. Im Zusammenhang ergibt sich damit durch weitere Untersuchungen, daß die allgemein als neutrophil bezeichneten Granula der polymorphkernigen Leukozyten tatsächlich basophil sind. Wurden Blutausstriche mit Giemsa Ph = 5,4 gefärbt, so erscheint das Protoplasma der feingekörnten Leukozyten homogen. Dagegen sind bei Kranken bei Anwendung dieser Färbemethode Körnchen darstellbar, die wahrscheinlich mit den toxischen Granula indentisch sind (32).

Es ist nach diesen Ausführungen wohl nicht angängig, von dem färberischen Verhalten der Leukozytengranula gegen ungepufferte Farblösungen

auf die chemische Struktur zu schließen. Die Reaktion einer wäßrigen Giemsalösung, wie sie im allgemeinen gebraucht wird, ist nach den Feststellungen von Mommsen nicht neutral, sondern schwach sauer.

Es erhebt sich weiter, besonders nach den Ergebnissen der Untersuchungen von Mommsen die Frage, ob die Granula der Leukozyten intra vitam vorhandene Gebilde sind, oder lediglich Gerinnungsprodukte im Zellleib, die erst im Augenblick des Todes entstehen. Wenn die Granula als solche in vivo nicht bestehen, so müssen sie zumindest in der lebenden Zelle bereits vorgebildet sein, — vielleicht haben sie dort nur eine andere Beschaffenheit — denn sonst wäre das so gesetzmäßige Auftreten der Leukozytengranula, häufig unter Anfüllung des ganzen Zelleibes, nicht zu erklären (Neumann).

Nach den Untersuchungen des eben erwähnten Forschers an der eos. Granulasubstanz des Pferdes ist bei der Bildung dieser Granula das Protoplasma, vielleicht auch der Kern, beteiligt.

Loele (27) kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu folgendem Schluß. Die Neigung vieler oxydasehaltiger Substanzen zur Quellung und Umformung in regelmäßige zylindrische und scheibenförmige Strukturen deutet darauf hin, daß die oxydierenden Stoffe bei manchen Bildungen der Zellen von großer Bedeutung sein können.

Bei der Erörterung der Farbstoffaffinität der Leukozytengranula haben wir gesehen, daß durch diese Methoden der chemische Aufbau der Blutzellenkörnelungen wenig geklärt werden kann. Durch Anwendung anderer indirekter Untersuchungsweisen, wie Löslichkeitsbestimmung, Aussehen und Quellungsvermögen kommt Neumann zu folgendem Ergebnis:

Die einzelnen Granulaarten des Menschen zeigen unter sich in ihrem chemisch-physikalischen Verhalten große Unterschiede.

Die Beobachtungen über Quellungsvermögen, leichte Löslichkeit, und zwar aller bisher darauf untersuchten Leukozytengranula sprechen dafür, daß ihnen in vivo eine dem lebenden Protoplasma ähnliche Konsistenz zukommen dürfte.

Außerhalb des Körpers, bzw. beim Absterben der Zelle kommt es je nach den äußeren Umständen zu Auflösung oder Konsolidierung der Granulasubstanz. Dies gilt vor allem für die eos. Granula, welche dadurch eine große Resistenz gegen Lösungsmittel erlangen.

Auch in vivo scheinen die neutrophilen Granula bei pathologischen Zuständen Veränderungen ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften mitzumachen (Toxische Granula nach Alder-Naegeli).

Ganz andere Verhältnisse als bei den Säugern herrschen bei den Vögeln und niederen Wirbeltieren. Das durchaus verschiedene Verhalten gegen Lösungsmittel spricht trotz größter färberischer Ähnlichkeit für eine ganz wesentliche Verschiedenheit im Bau der Granulaarten bei den einzelnen Klassen der Wirbeltiere.

2. Direkte Methoden.

Zur direkten Erforschung der Leukozytengranula wandte Neumann vor allem histochemische Untersuchungen an. Für die Körnelungen der menschlichen Blutzellen ergaben sich:

1. Anhaltspunkte für die Eiweißnatur aller daraufhin untersuchten Leukozytengranula. Bei der Kleinheit der in Betracht kommenden Gebilde und ihrer Empfindlichkeit gegen chemische Reagentien war es bis jetzt unmöglich, bestimmtere Anhaltspunkte für den chemischen Charakter, vor allem der neutrophilen Substanz, zu erhalten.

2. Es wird vermutet, daß die Granula Fett enthalten, zwar nicht Fett im gewöhnlichem Sinn, sondern es haften den Granula lipoidartige Stoffe an, die mehr oder minder fest mit ihnen verbunden sind. Auf die Ansicht von Sehrt, daß die Lipoide der Granula die Oxydasereaktion bedingen, wird später eingegangen werden.

3. Es ist nicht sicher festgestellt, ob der beträchtliche Gehalt der polymorphkernigen Leukozyten an Glykogen etwas mit den Granula zu tun hat oder nicht.

4. Wahrscheinlich ist Eisen in maskierter Form vorhanden, doch läßt sich der Nachweis wegen der Unsicherheit der Methode nicht mit Bestimmtheit führen.

5. Weiter glaubt man Phosphor nachgewiesen zu haben.

Speziell bezüglich der eos. Granulation des Menschen vermutet Neumann, daß diese bei den einzelnen Individuen, und auch in den einzelnen Organen desselben Individuum nicht immer von derselben Beschaffenheit ist. Nach Ansicht des Autors sei die eos. Granulation ein aktiver, aus der lebenden Zelle hervorgegangener Körper. Eine besondere Aufgabe der eos. Zelle wäre es, körperfremdes Eiweiß zu paralysieren. Ebenso ist es denkbar, daß auch bei den übrigen Leukozytengranulationen die Beschaffenheit in gewissen Bestandteilen sogar im selben Organismus durchaus nicht einheitlich ist.

Bezüglich der Oxydase- und Peroxydasereaktion der segmentkernigen Eosinophilen und Neutrophilen ist bereits erwähnt worden, daß sie immer positiv sind.

Was den chemischen Charakter der basophilen Leukozyten des Menschen betrifft, so wird vermutet, daß die Hauptmasse der Mastzellengranula aus einem wasserlöslichen Eiweißbestandteil zusammengesetzt ist; wasserlöslich zu mindest in der Zelle in vitro. Weiter glaubt man durch Färbemethoden festgestellt zu haben, daß die Granula aus dem Volutin, einem eigentümlichen, phosphorhaltigen Eiweißstoff, der fast in der ganzen belebten Natur zu finden ist, bestehen.

Nach Naegeli geben die Basophilen die positive Oxydase- und Peroxydasereaktion, während nach Ansicht von Hirschfeld und japanischer Forscher der Ausfall der Oxydationsmethoden an diesen Zellen zu 90% negativ ist. Betreffs der Ergebnisse der Untersuchungen des Verfassers über die Färbbarkeit der basophilen Zellen sei auf den letzten Abschnitt dieser Arbeit verwiesen.

Die durch die Pappenheim'sche Färbemethode in den Monozyten darstellbaren Granula sind sehr feinkörnig. Die Angaben über ihr Verhalten zur Oxydase- und Peroxydasereaktion sind widersprechend. Fiessinger (11—15), der zuerst im Jahre 1912 angab, die Monozyten seien oxydase- und peroxydasenegativ, schreibt 1921, daß mehr Leukozyten Peroxydasen enthalten, als es dem Anteil der polynukleären Zellen entspricht. Daraus sei zu folgern, daß wahrscheinlich ein Teil der mononukleären Zellen Peroxydase enthielten. Weiter schreiben Popper (47) und Richter (48), daß in den Mononukleären stets Fermentgranula zu finden sind, jedoch weniger als in den Polynukleären. Nesterow (38) arbeitete mit der Farbreaktion nach Epstein (10) und erhielt gleichfalls positive Granulationen in den Monozyten. Nach Naegeli enthalten die Monozyten zwar eine feine, doch deutlich positive Oxydase- und Peroxydasekörnelung. Während viele Autoren, u. a. auch Hirschfeld und W. H. Schultze, Naegeli zustimmen, finden wir eine Ablehnung der Naegelischen Forschungsergebnisse durch Schilling und Stockinger. Es würde zu weit führen, hier Stockingers Anschauungen über die Bedeutung der Leukozytengranulationen wieder zu geben. Es sei nur erwähnt, daß der Autor

ganz auf dem Boden der unitaristischen Lehre von Maximow steht. Betreffs der Monozyten gibt Stockinger an, daß nur bei stark ausgeprägter positiver Oxydasereaktion der neutrophilen Leukozyten vereinzelt schwach positive Monozyten zu erkennen sind. Den Unterschied zwischen Naegelis und seinen Forschungen erklärt er mit den unter verschiedenen klimatischen Verhältnissen angestellten Versuchen (Naegeli-Schweiz, Stockinger-Holstein).

Für das Monozytenproblem von Bedeutung ist die Frage der exogenen Entstehung der in ihnen enthaltenen Körnelungen.

3. Exogene Entstehung der Monozytengranula.

Durch Untersuchungen von Freifeld und Ginsburg (16) an in vitro Kulturen sowohl von Vogel- wie Menschenblut ergab sich, daß die positive Oxydasereaktion dieser Zellen von dem Vorhandensein von Pseudoeosinophilen und Neutrophilen abhängig war. Die beiden Forscher schlossen aus ihren Versuchen, daß die oxydasepositiven Körnchen der Mononukleären phagozytären, — durch Aufnahme von zerfallenden Neutrophilen — Ursprungs sind. Weiter wird in der Arbeit der Forscher über ihre Versuche die Frage angeschnitten, ob nicht auch die oxydasepositiven Körnchen der Neutrophilen nur aus beim Hb. Pigmentstoffwechsel freigewordenen, oxydasepositiven Substanzen herzuleiten sind.

Über die Frage der exogenen Entstehung der Monozytengranula liegen weitere Untersuchungen vor.

Wallbach (68) spritzte in Wasser lösliche Niederschläge des Meerrettigpreßsaftes, der nach Willstätter sowohl Oxydasen wie Peroxydasen enthält, subkutan ein. Es zeigte sich eine Speicherung in erster Linie an den segmentierten und sonstigen myeloischen Zellen. In geringerem Maße sind aber auch Histiozyten und Fibrozyten an der Oxydasespeicherung beteiligt.

Die Aufnahme von Oxydasesubstanzen läßt sich nur bei lokalen Reaktionsherden am Ort der Injektion feststellen, so an der Subkutis und an Hohlraumexsudaten. Niemals ist aber eine allgemeine Oxydasespeicherung an einem ganz bestimmten Zellsystem des Organismus zu erreichen. Nagel und Büngler (35) zeigten an Hand von Versuchen, daß es in vitro nicht möglich ist, durch Zusatz von Oxydasen und Peroxydasen im überlebenden Blut die oxydasenegativen Blutmonozyten der Kaninchen in oxydasepositive Formen umzuwandeln. Dagegen gelingt es, durch Einspritzung von Oxydasen in die Pfortader im Lebervenenblut vermehrte oxydasepositive Monozyten nachzuweisen. In den Versuchen können die Oxydasen nur durch Phagozytose in die Monozyten gelangt sein.

Auf Grund der Untersuchungsergebnisse von Wallbach darf man dem Oxydasegehalt der einzelnen Leukozyten, nach den Feststellungen von Nagel und Büngler dem Oxydasegehalt der einzelnen Monozyten keine entscheidende Bedeutung zumessen, sondern muß streng zwischen endo- und exogenen Oxydasen unterscheiden.

Aus dem Ergebnis der bisher geschilderten Untersuchungen kann man, — auch Neumann kommt auf Grund seiner eigenen Forschungen zu demselben Schluß, — kein sicheres Urteil über die chemische Natur der Leukozytengranula gewinnen. Zur Deutung der Oxydase- und Peroxydasereaktion der granulierten menschlichen weißen Blutzellen ist jedoch die Kenntnis vom Aufbau ihrer Granulationen wichtig, weil sie zu den Farbreaktionen in enger Beziehung stehen. Da die eos. Leukozytengranulation des Pferdes in solchen Mengen von Neumann dargestellt wurde, daß sie von ihm durch mikro- und makrochemische Methoden untersucht werden konnte, sei hier auf die Ergeb-

nisse dieser Forschungen aus folgendem Grunde eingegangen. Vielleicht tragen die nun gewonnenen Erkenntnisse, wenn man sie auch nicht ohne weiteres auf die menschlichen Granulationen anwenden kann, doch dazu bei, das Wesen der Oxydationsreaktionen zu klären.

C. Die eos. Granula des Pferdes, ihr chemischer Aufbau, die in ihnen vorkommenden Oxydationsfermente (36).

Die eos. Granulation des Pferdes, ausgezeichnet durch besondere Größe, wobei aber doch die einzelnen Granula ungefähr ein bis drei mü in ihrem Durchmesser differieren können, besitzt im nativen Blut ausschließlich eine grüne Farbe und ein eigentümlich glänzendes Aussehen.

In vivo leicht löslich, macht sie aber in vitro bei unveränderter Form und Färbbarkeit scheinbar einen Erstarrungsprozeß durch.

Nach histologischen Untersuchungen ist bei der Bildung der Granula zumindest das Protoplasma, wenn nicht auch der Kern, beteiligt.

Die eosinophile Granulasubstanz ist ein ungemein kompliziert gebautes Gebilde, bestehend aus zahlreichen Anteilen, welche vielleicht nicht in vivo, sicher aber bei Isolierung außerhalb des Körpers und wahrscheinlich auch in der toten Zelle ungemein fest aneinander gekittet sind. Die Granula enthalten:

1. Einen spezifischen Farbstoff, dessen Zusammensetzung unbekannt ist.
2. Einen stickstoffhaltigen Anteil, der höchstwahrscheinlich eiweißartiger Natur ist.
3. Ein Lipoid.
4. Eisen, jedoch ist der Gehalt wechselnd; es finden sich:
   a — Granula ohne Eisen.
   b — Granula mit Hb.
   c — Granula mit Eisen, ohne Hb.
5. Phosphor, Jod, Kalzium, Natrium.

Es wurde bezüglich des färberischen Verhaltens festgestellt, daß auch bei stickstofffreien Granula die eosinophilen Körnchen als solche färberisch zu erkennen sind. Dieser Befund läßt die Theorie, daß bei den eos. Granula des Pferdes ein basischer Eiweißkörper maßgebend für seine Azidophilie ist, unmöglich erscheinen (siehe dazu Mommsen 32).

An Oxydationsfermenten enthält die eos. Granulasubstanz des Pferdes eine Oxydase und eine Peroxydase.

Die Peroxydase
zeigt eine große Resistenz gegen Säuren und Laugen. Auch stickstoffarme und eisenfreie Präparate geben positive Benzidinreaktion. Es ist wohl nicht ein einziger Körper, der die Reaktion bedingt, sondern man kann sicher:

1. Einen stickstoffhaltigen Anteil.
2. Einen stickstofffreien Anteil, an Eisen gebunden.
3. Lipoide.
4. Einen phosphorhaltigen Anteil erkennen, die alle peroxydasehaltig sind.

Die Oxydase
ist sehr empfindlich gegen chemische Reagentien; die Indophenolblausynthese ist nur in schwach akalischem Milieu möglich, sie wird durch Blausäure gehemmt.

Trotz des Fettgehaltes der Granula darf die Indophenolblausynthese nicht als eine Fettfärbung aufgefaßt werden, wenngleich es nicht ausgeschlossen ist, daß der Fettkörper in irgendeiner Weise aktivierend auf die Oxydasereaktion wirkt.

Durch Oxydationsmittel, z. B. Kaliumbichromat, kann man die Indophenolblausynthese in vitro herbeiführen (siehe unter Ionentheorie). Das nun gebildete Indophenolblau färbt, bringt man Blutausstriche in die Lösung, auch die Granula der Leukozyten. Auf Grund dieser Versuche greift Hollande die Oxydasereaktion an; er behauptet, die Blaufärbung der Granula sei nur das Zeichen einer Indophenolophilie, d. h. eine Anfärbung mit dem Indophenolblau, das sich durch irgendwelche Stoffe, u. a. auch durch die Einwirkung des Luftsauerstoffes, bilden kann.

Auf diese Einwürfe von Hollande ist zu erwidern, daß die isolierten Granula die Indophenolblausynthese auch unter Luftabschluß geben (Neumann). Die Oxydase ist also in den Granula selbst nachweisbar.

Durch Versuche stellte Neumann fest, daß die Oxydasereaktion der eos. Granula des Pferdes in der Zelle nicht nur durch die Tätigkeit des Granulum allein, sondern auch durch andere Zellteile, ob Kern oder Plasma, ist unbekannt, zu stande kommt.

Zusammenfassend sei über unsere Kenntnisse der Leukozytengranula folgendes gesagt:

Die chemische Struktur der menschlichen Leukozytengranula kann durch die Frage der Farbstoffaffinität wenig geklärt werden.

Durch Beobachtungen über Löslichkeit, Quellungsvermögen und durch histochemische Untersuchungen wird auf das Vorhandensein von Eiweiß, Fett, Kohlehydrat und Eisen, vielleicht auch Phosphor, mit großer Wahrscheinlichkeit geschlossen.

Die Untersuchungen Neumanns erbringen den Beweis, daß das eos. Granulum des Pferdes in Verbindung mit anderen Bestandteilen der Zelle, — ob durch Adsorption oder durch Tätigkeit des lebenden Protoplasmas und Kernes, sei dahingestellt, — der Träger oxydativ wirkender Eigenschaften ist.

Von den nachgewiesenen Oxydationsfermenten zeichnet sich die Oxydase der Peroxydase gegenüber durch große Empfindlichkeit gegen verschiedene Reagentien aus. Die Beziehungen der Fettkörper zur Oxydasereaktion sind noch nicht geklärt.

Die Peroxydase ist in mehreren Körpern nachweisbar, darunter befinden sich auch solche, die frei von Eisen sind.

Wenn auch die Kenntnisse über den chemischen Aufbau der eos. Granula des Pferdes sich kaum ohne Bedenken auf die menschlichen Körnelungen der Leukozyten übertragen lassen, so sind sie doch zum Verständnis des nächsten Kapitels, das die Frage der die Oxydationsreaktionen gebenden Stoffe behandelt, wichtig.

II. Oxydase- und Peroxydasereaktion und die sie bewirkenden Stoffe.

In dem vorhergehenden Teil der Arbeit wurde nachgewiesen, daß die Benzidin- und Indophenolblaureaktion sich sicher an den Leukozytengranulationen abspielen.

Zur Erklärung der Oxydationsreaktionen sind verschiedene Theorien aufgestellt worden.

Die einen Forscher nehmen als Ursache die Wirkung von Ionen an, andere sehen in dem Lipoid, das in den Körnelungen vorhanden ist, den maßgebenden Faktor für die Farbreaktionen. Die Anhänger der Fermenttheorie sind folgender Meinung: In oder an den Körnelungen befinden sich Fermente, die Oxydationsvorgänge beschleunigen; sie werden als Oxydasen und Peroxydasen bezeichnet.

A. Fermenttheorie und Oxydase- und Peroxydasereaktion.

Wie schon die Endung -ase der Bezeichnung Oxydase und Peroxydase besagt, wurde bei ihrer Namengebung von den Entdeckern angenommen, daß diese Stoffe zur Reihe der Fermente oder Enzyme gehören.

Nach der heute fast allgemein angenommenen Deutung Willstätters ist ein Ferment oder Enzym, — beide Ausdrücke sind als durchaus gleichbedeutend anzusprechen, — chemisch wie folgt zu beschreiben (40; 41): Es handelt sich nicht um einen strukturell definierten Stoff an sich, sondern um ein System. Der eigentliche Stoff Enzym steht im innigen Zusammenhang mit einem sog. kolloidalen Träger, und erst dieser Kombination ist die Wirksamkeit des Enzyms als System beizumessen.

Ein Ferment ist also ein strukturbedingter Stoff in einem besonderen Zustand, der der Oberflächenausbreitung auf dem Träger zuzuschreiben ist. Analytisch stehen wir vor einer sonderbaren Tatsache. Die chemischen Reaktionen der meisten hochgradig gereinigten Enzyme weisen auf keine einzige bestimmte Körperklasse.

Eine besonders hervorstechende Eigenschaft der biologischen Katalysatoren ist ihre spezifisch gerichtete Wirkung. Danach folgt dann auch die Einteilung der Fermente, da keine Möglichkeit besteht, sie nach äußeren Eigenschaften zu beschreiben.

1. Einteilung der Fermente.

Nach Oppenheimer (40; 41) kennt man zwei große Gruppen von Fermenten:

A. Hydrolasen.
B. Desmolasen.

Bei den Desmolasen, man versteht darunter Enzyme, die Moleküle unter Energieumsetzung verändern, sind folgende Untergruppen bekannt:

B. I. Zymasen.
II. Isolierbare Teilfermente.
III. Sonstige Stoffwechseldehydrasen.
IV. Oxydationsfermente.

dazu gehören:

Oxydasen,
Peroxydasen,
Chromodehydrasen,
Chromooxydasen und andere.

Die Einteilung der Oxydasen erfolgt nach ihrer Wirkung auf bestimmte Substrate.

IV a. Oxydasen.
1. Phenolasen und Polyphenolasen.
2. Tyrosinasen.
3. Dopaoxydasen.
IV b. Peroxydasen.

Ein anderes Einteilungsprinzip der Oxydasen finden wir bei Loele (27). Er teilt die nicht an Hämoglobin gebundenen Oxydasen, die auch als Oxone bezeichnet werden, folgendermaßen ein:

1. Primäre Oxone.

Darunter fallen alle primär an bestimmten Zellstrukturen vorkommenden Oxydasen und Peroxydasen.

2. Sekundäre Oxone.

Sie entstehen dadurch, daß gelöste Zelloxydasen und Peroxydasen sich an manchen Zellstrukturen niederschlagen, die an sich keine Oxydase- und Peroxydasereaktion geben. Es ist nach Loele bei Fixierung von nicht oxonhaltigem Material mit oxonhaltigem Material die Möglichkeit der Übertragung der Oxydasen auf an sich negative Strukturen möglich.

Von Interesse für diese Arbeit sind die Oxydationsfermente. Ihr mikromorphologischer oder histochemischer Nachweis in den Zellen beruht auf Farbreaktionen. Als Substrate werden dabei fast ausschließlich Phenole, Polyphenole und ihre Verwandten benutzt. Man hat deshalb diese Oxydationsfermente auch als Phenolasen bezeichnet.

Ganz allgemein kommt es bei Einwirkung von Oxydasen zur Farbstoffbildung auf folgende Weise:

In den Zellen befindet sich ein Stoff, der die Fähigkeit hat, Sauerstoff an eine oxydable Substanz, das Substrat, zu binden und so eine intrazelluläre Farbstoffbildung zu bewirken.

Zu den Phenolasen gehört auch die Nadioxydase, die fähig ist, alpha-Naphtol und Dimethylparaphenylendiamin durch Bindung von Sauerstoff in Indophenolblau umzuwandeln.

Dieses Ferment kommt im tierischen und pflanzlichen Organismus vor. Für uns ist nur ihr Nachweis in den weißen Blutzellen von Wichtigkeit.

2. Die Nadimethode und ihre Modifikationen, ihre Chemie und ihre Geschichte.

Im Jahre 1885 wies Ehrlich zuerst nach, daß bei Injektion von Indophenolweiß in den lebenden Organismus in bestimmten Körperzellen, welche er als besonders oxydativ tätig ansah, sich Indophenolblau bildet. Der Versuch beruht auf der von Koechlin und Witt entdeckten Küpeneigenschaft des Indophenolblau. Ehrlich stellte damals die Hypothese auf, daß bestimmte Zellen des Körpers durch besonders oxydative Eigenschaften sich auszeichnen, deren Nachweis eben durch die intravitale Indophenolblausynthese gelingt.

Röhmann und Spitzer fanden im Jahre 1895 spezieller, daß eine Mischung von alpha-Naphtol und Dimethylparaphenylendiamin in Gegenwart von oxydasehaltigem Pflanzenmaterial sehr schnell zu Indophenolblau oxydiert wird.

Vernon (66; 67) arbeitete die Reaktion 1901 zu einer quantitativen Methode aus, in dem er die Menge des gebildeten Farbstoffes kolorimetrisch bestimmte.

Dietrich und Liebenmeister benutzten die Nadimethode zur Darstellung sich blau färbender Körnchen in Milzbrandbazillen.

Auch Winkler hatte schon im Jahre 1901 in Ausstrichen von Trippereiter die gleiche Farbreaktion an den Granula der menschlichen polymorphkernigen Leukozyten nachgewiesen. In die Hämatologie führte derselbe Forscher die Methode im Jahre 1907 ein. Er wies nach, daß bei Verwendung von alpha-Naphtol und Dimethylparaphenylendiamin sich bestimmte Stellen der Leukozyten rasch blau färben. Sehr bald wurde festgestellt, daß es sich wahrscheinlich um die Granula der dem Knochenmark entstammenden Leukozyten handele, welche so im Sinne von Ehrlich als exquisite Sauerstofforte aufgefaßt wurden.

W. H. Schultze baute 1908 die Reaktion für die menschliche Pathologie und allgemeine Histologie aus. Seither hat sich eine große Zahl von Arbeiten mit dem Problem befaßt.

Die Indophenolblausynthese von Winkler-Schultze (1931) sei an dieser Stelle genauer geschildert.

1. Fixation

der gut lufttrockenen Blutausstriche 5 Minuten in 40% Formol-Alkohol ā ā.

2. Färbung mit zwei Lösungen.

Lösung I.

Alpha-Naphtol, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung 1,0/100,0; dazu auf 100 ccm 1 ccm 1/10 Normalnatronlauge.

Lösung II.

1% Lösung von Paradimethylparaphenylendiaminbase (Merk). Gleichfalls in physiologischer Kochsalzlösung.

Ein Teil der Lösung I zu vier Teilen der Lösung II, dann filtrieren.

Die Präparate kommen 3 Minuten in die Mischung. Die Granula werden dadurch tiefblau gefärbt.

Nachfärbung: Giemsa.

Außer dem Nadigemisch sind noch eine größere Reihe von Phenolen und anderen Substanzen bekannt, die gleichfalls denselben histochemischen Effekt wie die Nadireaktion erzielen. Das Vorkommen dieser Oxydasen deckt sich mit dem der Nadioxydasen, soweit die Blutzellen in Betracht kommen. Es seien erwähnt:

Modifikation B von Schultze.

2% Lösung von Beta-Naphtolnatrium mit einer 1% Lösung von salzsaurem Dimethylparaphenylendiamin zu gleichen Teilen. Granula sind intensiv grün, bei Benutzung von Leitungswasser als Lösungsmittel schwarz.

Modifikation C von Schultze.

Alkalische Alpha-Naphtollösung 1% und 1% Lösung von Paranitrosodimethylanilin zu gleichen Teilen. Die Granula sind braunschwarz.

Suprareninmethode.

Es kommt nach Suprarenineinwirkung 0,1/100,0 zur Farbreaktion. Die Granula sind braun.

Alpha-Naphtoloxydasereaktion

und ihre verschiedenen Modifikationen.

Guajakmethode.

Die Granula sind grün gefärbt.

Tyrosinmethode.

Nach Tyrosineinwirkung sind Farbreaktionen beschrieben worden.

Die Dopamethode

sei wegen ihrer Beziehung zur Frage der spezifischen Fermente hier näher geschildert.

Nachdem von Guggenheim in Viccia Taba die sich beim Trocknen schwarz färbende Substanz als Dioxyphenylalanin — ein Brenzkatechinderivat, von Bloch Dopa genannt — erkannt wurde, kam Bloch auf den Gedanken, es könnte dieser Stoff sein, der sich unter Einwirkung eines Oxydationsfermentes in der Haut der Säugetiere schwarz färbe. Gefrierschnitte der Haut wurden mit Dopa behandelt, an den Stellen, die in vivo Pigment erzeugen, bildete sich eine Schwärzung. Da bei analoger Behandlung in Tyrosin dieser Farbumschlag nicht stattfindet, so zieht der Autor den Schluß, daß das in diesen Häuten sich umwandelnde Melanin mit Dopa identisch sei. Die Umwandlung erfolge vermittels eines spezifischen Fermentes, das er Dopaoxydase nannte. Dies sei nur in den Basalzellen der Haut und in wenigen anderen Zellen, z. B. auch den myeloischen Leukozyten (6) lokalisiert (Chodat, R. 9).

Es wird von Gräff (18—20) darauf hingewiesen, daß man bei verschiedenem Ausfall der Reaktionen mit verschiedenen Substraten — bei gleichem Zellmaterial und unter sonst gleichen Bedingungen — nicht ohne weiteres verschieden eingestellte Phenolasen annehmen darf, welche ganz bestimmte Substrate durch Sauerstoffbindung in Farbverbindungen umzu-

wandeln vermögen, wie wir z. B. bei Bloch und Peck sehen. Der obenerwähnte Autor sieht die Ursache des wechselnden Ausfalles in der verschieden gearteten Oxydabilität der Phenole.

Zur Chemie der Indophenolblausynthese ist zu bemerken, daß, nach Loele, trotz zahlreicher Arbeiten das Wesen der Indophenolblaureaktion auch heute noch nicht völlig geklärt ist.

Wahrscheinlich geht die chemische Reaktion in zwei Phasen vor sich. Es findet zuerst eine Oxydation mit nachfolgender Synthese statt. Die sich bildende Leukoverbindung geht dann in Indophenolblau über (1; 27).

$H_2N \cdot C_6H_4 \cdot N(CH_3)_2$ plus $C_{10}H_7 \cdot OH$ plus 0
Dimethylparaphenylendiamin Naphtol

zu $(CH_3)_2 \cdot N \cdot C_6H_4 \cdot NH \cdot C_{10}H_6 \cdot OH$ plus H_2O
Leukoverbindung

zu $(CH_3)_2 \cdot N \cdot C_6H_4 \cdot N : C_{10}H_6 : 0$ oder
Indophenolblau

$(CH_3)_2 \cdot N \cdot C_6H_4 \cdot N \cdot C_{10}H_6 \cdot O$
Indophenolblau /.....

3. Die Benzidinwasserstoffsuperoxydmethode und ihre Modifikationen, ihre Chemie und ihre Geschichte.

Den Phenolasen bzw. Polyphenolasen stehen die ebenfalls kolorimetrisch und durch Farbreaktionen bestimmten Peroxydasen gegenüber. Sie waren schon lange, freilich zunächst ohne Berücksichtigung einer Lokalisation in der Zelle, nachgewiesen.

Zuerst fand Vitali, daß Guajakharz durch Eiter gebläut wird. Linossier untersuchte das die Reaktion in Eiterleukozyten bedingende Prinzip näher. Nach Neumann war es dieser Forscher, der zum ersten Mal in der Literatur von Peroxydasen sprach. Er verstand darunter Körper, die unter Zersetzung von Peroxyden Oxydationsprozesse hervorrufen (36; 37). Später haben Kreibisch, Loele, Fiessinger, Sato und Graham die Peroxydasereaktion weiter ausgebaut.

Nach den heutzutage im allgemeinen in der Hämatologie angewandten Peroxydasemethoden handelt es sich meistens um eine Farbreaktion vermittels einer alkoholischen Benzidinwasserstoffsuperoxydlösung. Es seien verschiedene Methoden geschildert.

Methode Graham:

Fixierung.

1 Teil 40% Formaldehyd plus
9 Teile 95% Alkohol,

damit den frischen Ausstrich einige Sekunden fixieren, dann leicht mit aqua dest. abwaschen.

Färbung.

Einige Kristalle Benzidin zu
0,02 ccm H_2O_2 und 10,0 ccm 40% Alkohol
5 Minuten färben, dann abspülen.

Nachfärbung.

10 ccm gesättigte Lösung von Thionin in 75% Alkohol zu 40 ccm Anilinwasser. ½ bis 1 Minute färben.

Die Granula sind bei dieser Methode gelbbraun gefärbt. Graham teilte die Neutrophilen je nach der Anzahl der in ihnen vorhandenen gefärbten Körnelungen in vier Gruppen ein. Jedoch konnte durch Untersuchungen von Mielke (31) nachgewiesen werden, daß bei längerer Einwirkung der Benzidin-Wasserstoffsuperoxydlösung auf die Ausstriche die verschiedenen „Grade" der Reaktion verschwanden; sie waren also durch technische Faktoren hervorgerufen.

Methode Sato:

Fixierung.

Der gut lufttrockene Ausstrich wird für 30 Sekunden mit ½% $CuSO_4$ Lösung übergossen. Dann abgießen ohne abzuspülen.

Färbung.

Benzidin-H_2O_2-Lösung.

Benzidin 0,2 g; H_2O_2 gtt. IV.

aqua dest. ad 200,0.

Lösung für 2 Minuten auf den Objektträger.

Vorsichtig mit aqua dest. abspülen.

Nachfärbung.

1 Minute mit Safranin.

Anmerkung.

Jede Berührung mit Fließpapier ist zu vermeiden. Benzidin-H_2O_2-Lösung ist vor Gebrauch zu filtrieren.

Die Granula zeigen bei positiver Reaktion eine blaue Farbe. Zellkerne schwach rotgelb.

Methode Brinnitzer:

Färbung und Fixierung wie bei Sato.

Nachfärben mit Giemsa-Romanowsky-Lösung für 60 Minuten.

Granula blauschwarz, außerdem panoptische Giemsafärbung des Zellprotoplasmas und der Kerne.

Methode Moschkowski:

Silmultane Giemsa-Benzidin-Färbung.

Fixierung.

3 Minuten in 90% Methylalkohol.

Nachspülen mit aqua dest.

Färbung.

Mit Giemsalösung; zur Verdünnung des Farbstoffes frisch angefertigte Benzidin-H_2O_2-Lösung. Und zwar:

Einige Kristalle Benzidin in aqua dest. lösen, kräftig umschütteln, filtrieren. Auf je 1 ccm Filtrat ½ bis 1 Tropfen H_2O_2.

Granula braun bei panoptischer Giemsafärbung des Zellprotoplasmas und der Kerne.

Neben diesen Peroxydasemethoden sind noch andere bekannt. So beschreibt z. B. Loele in seinen Arbeiten eine Nadi-, alpha-Naphtol- und Paraphenylendiaminperoxydase.

Auch die Chemie der Benzidinreaktion ist nicht völlig geklärt (9).

$H_2N \cdot C_6H_4 \cdot NH_2$

4 · 4' Diamino-diphenyl = Benzidin.

In gesättigter Lösung (0,04%) oxydiert sich Benzidin in chinoide Stoffe. Diese stehen zum Benzidin in ähnlicher Beziehung wie das Chinhydron zum Hydrochinon.

Chinhydron

ist eine lockere Verbindung von Chinon und Hydrochinon.

$2\,C_6H_4(OH)_2$ plus $O_2 = 2\,H_2O$ plus $2\,C_6H_4O_2$

Hydrochinon Chinon

Nach Madelung sind die blauen Substanzen, die bei der Reaktion gebildet werden, Farbsalze:

Diphenochinon-Diimoniumsalze der obenerwähnten chinoiden Stoffe mit Benzidin. Chodat (9); Madelung (28).

4. Beeinflussung der Oxydase- und Peroxydasereaktion.

Einen weiteren Beitrag zur Frage der Fermentnatur der Oxydase- und Peroxydasereaktion liefert die Kenntnis von ihrer Beeinflussung.

Durch Untersuchungen stellte Schultze fest, daß die Oxydasereaktion nur in alkalischem Milieu möglich ist. Gräff stellte durch systematische Versuche den Einfluß der OH-Ionen auf den Verlauf der intrazellulären Indophenolblausynthese fest. Es zeigte sich dabei, daß der optimale Ph-Wert der Reaktion für tierisches Gewebe und Leukozyten bei Ph = 8 bis 9 liegt.

Nach Bansi und Ucko (2) sind die Wirkungen durch Säuren und Basen und andere Zusätze zum Reaktionsgemisch nicht immer auf Rechnung einer Beeinflussung des Oxydationsfermentes zu setzen. Man kann nicht nur von der optimalen H-Ionenkonzentration eines Fermentes sprechen, sondern, — da man auch den Einfluß auf die oxydable Substanz bedenken muß, — höchstens von dem optimalen Ph-Wert eines Fermentes auf ein ganz bestimmtes Substrat.

Eingehende gründliche Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes, — also elektrischer Wellen, — auf Peroxydasen finden wir durch Bering und Meyer (3). Es trat eine Förderung der Fermentwirkung bei kleinen Lichtdosen auf. Bei Zunahme der Lichtintensität wurde sehr bald eine Hemmungswirkung der Reaktion festgestellt. Dabei ist die Wirkung der einzelnen Strahlenarten verschieden. Die roten Strahlen lassen die Peroxydasen unbeeinflußt, die gelben haben bei genügender Einwirkung fördernden Einfluß, ebenso die grünen und blauen. Die blauvioletten und inneren ultravioletten rufen neben der größten chemischen Wirkung zugleich am frühzeitigsten eine Schädigung der Fermentwirkung hervor.

Weitere Untersuchungen von Wedder (69) über den Einfluß des ultravioletten Lichtes auf die nach der Grahamschen Methode gefärbten Blutausstriche zeigen die Bedeutung der dabei auftretenden Erwärmung. Die von anderen Autoren festgestellte Beeinflussung im Sinne einer Abschwächung der Reaktion durch Quarzlampenbestrahlung hatte dieses Moment bisher noch nicht berücksichtigt (25; 46). Bei den Versuchen von Wedder verschwand die Peroxydasereaktion, wenn die Präparate etwa 10 Minuten lang den ultravioletten Strahlen der künstlichen Höhensonne ausgesetzt wurden. Da Erwärmung allein schon die Peroxydasegranula vernichtet, wurden die Wärmestrahlen durch eine Kobaltchloridlösung teilweise absorbiert. Jetzt war erst ein Schwund der Peroxydasegranula nach 45 Minuten dauernder Bestrahlung zu beobachten. Die Peroxydasegranula sind, wie man aus diesen Versuchen entnehmen kann, sowohl gegen Wärme als auch ultraviolette Strahlen empfindlich.

Es ist nach diesen Versuchen nicht mit Sicherheit festzustellen, ob die Ursache der Wirkung der Strahlen in einer Beeinflussung des Fermentes, oder des Ph-Wertes der Reaktion und des ganzen Substrates zu suchen ist.

Von der Wirkung der Blausäure ist bekannt, daß gegen direkte Blausäureeinwirkung nur die Oxydasereaktion empfindlich ist, die Peroxydasereaktion dagegen nicht. Merkwürdig erscheint nun, daß bei Blausäurevergiftung, wo nachweislich die innere Atmung, — deren Wirkung man doch den Oxydationsfermenten zuschreibt, — aufgehoben ist, keine Beeinflussung der Oxydase- und Peroxydasereaktion stattfindet. Weiter ist zur

Fermentfrage zu bemerken, daß die Peroxydase der Benzidinreaktion eine große Resistenz gegen verschiedene, hochkonzentrierte organische und anorganische Lösungsmittel aufweist.

Die bei den anderen Fermenten in vivo bekannten Wirkungen konnten bei der Oxydase- und Peroxydasereaktion mit wenigen Ausnahmen nicht gefunden werden. Einwandfrei ist wohl nur die Mitwirkung von Oxydationsfermenten bei der Melaninbildung im Tierkörper nachgewiesen. Sonst bezieht sich alles, was zur Prüfung der Oxydase und Peroxydase und zu ihrem Nachweis verwendet wurde, auf Reaktionen in vitro.

B. Autooxydation.

Bei Beschäftigung mit der Frage, welche Körper die Sauerstoffübertragung bewirken, hatte Verf. in der Geschichte der Oxydasereaktion erwähnt, daß Ehrlich selbst an die Fermentnatur der die Farbreaktionen gebenden Körper dachte. Bei anderen Forschern regten sich bald Zweifel, ob wirklich die positive Reaktion beweisend für oxydativ fermentartige Eigenschaften der gefärbten Elemente sei. Es wurde durch Versuche festgestellt, daß die Fähigkeit, Indophenolblau aus alpha-Naphtol und Dimethylparaphenylendiamin zu bilden, nicht nur für Zellfermente spezifisch ist. Ehe wir auf die Indophenolblaubildung durch anorganische Stoffe eingehen, sei die Autooxydation und ihre Beeinflussung durch kolloidhaltige Stoffe geschildert.

Loele weist in seinen Arbeiten darauf hin, daß

1. alpha-Naphtol,
2. Paraphenylendiamin,
3. das Gemisch beider Substanzen,

autooxydable Substanzen sind. Das dabei gebildete Indophenolblau kann natürlich auch die Leukozytengranulationen anfärben. Auf Grund dieser Tatsache griff man die Nadisynthese an und behauptete, die Farbverbindung sei nicht durch Zell-Leistung entstanden. Dazu ist folgendes zu sagen.

1. Die Farbstoffbildung an den granulierten Zellen geht schneller vor sich als die Autooxydation des Farbgemisches an der Luft.

2. Bei der richtig ausgeführten Nadireaktion sind die Ausstriche durch die sie umgebende Farblösung von der Sauerstoffeinwirkung der Luft ausgeschlossen. Es ist an die Leukozytengranula ein oxydativ wirkender Körper gebunden, der den in geringen Mengen in der Flüssigkeit enthaltenen Sauerstoff zur Bildung der Indophenolblausynthese überträgt. Auch Neumann betont in seiner Arbeit, daß gerade die Farbstoffsynthese unter Luftabschluß als wichtigstes Merkmal der Nadireaktion zu werten ist.

3. Es sind auch noch andere, der Nadireaktion ähnliche Oxydationsreaktionen bekannt, die nicht oder nur sehr schwer autooxydabel sind, und die gleichfalls an den Granulationen Farbreaktionen geben.

Sereni (56) untersuchte die Beeinflussung der Ausfällung des Indophenolblau durch kolloide Lösungen. Es konnte die von Reed aufgestellte Behauptung, daß dabei das Indophenolblau nicht in Kristallen, sondern in Form von ovalen Granula ausfalle, auch bei Anwendung von Blutserum nur zu einem kleinen Teil bestätigt werden.

C. Ionentheorie.

Der Vorgang der Sauerstoffübertragung bei der Oxydase- und Peroxydasereaktion ist, was die Natur des oxydativ wirkenden Körpers anbetrifft, noch nicht völlig geklärt. Die Anhänger der Ionentheorie glauben, daß Kationen

und Anionen entscheidende Bedeutung bei der Farbstoffbildung zukommt.

In erster Linie unter den Kationen, die als Ursache der Oxydationsreaktionen angesehen werden, steht das Eisen. Bereits Spitzer vermutete, daß an dem Zustandekommen der zelligen Indophenolblaureaktion eisenhaltige Nukleoproteide sich beteiligten. Gestützt auf die Arbeiten von Warburg, daß die Atmung der Zelle auf der Eigenschaft des Eisens beruht, aus dem Ferrosalz in das Ferrisalz überzugehen und umgekehrt, demnach Eisen die Sauerstoffübertragung zu vermitteln vermag, hat Gräff und nach ihm Katsunuma die Indophenolreaktion als eine katalytische Eisenreaktion bezeichnet. Auch Oppenheimer spricht in seinem Lehrbuch der Enzyme die Ansicht aus, daß dem Eisen die Hauptwirkung bei der Oxydasereaktion zuzuschreiben sei. Ob es allerdings das Eisensystem von Warburg sei, sei dahingestellt. In seinen früher veröffentlichten Arbeiten neigt Oppenheimer allerdings der Anschauung zu, daß es sich bei den Oxydasereaktionen um hochmolekulare Stoffe kolloidaler Natur handeln müsse, — also Eiweiß? — die elektrisch amphoter dissoziiert sind und zu Nebenvalenzen neigen.

Versuche verschiedener Forscher ergaben die oxydativen Fähigkeiten von Salzen. Die folgende Tabelle ist aus den Arbeiten Neumanns entnommen.

Übersicht über die oxydativen Fähigkeiten von Salzen. (Nach Neumann.)

Salz	Oxydase		Peroxydase	
K Br. 1%	+		+	
K Cl 1%	+		+	
K Cl 5%	(+)		+	
Na Cl	+		+	
$Mg\,Cl_2$	+		+	
$Ba\,Cl_2$	+		+	
$K\,Cl\,O_4$	++	erhitzt	++	erhitzt
$Ca\,Cl_2$	++	erhitzt	++	bei Zimmer-
$Zn\,Cl_2$	+	erhitzt	++	temperatur
$Mg\,SO_4$	++	erhitzt	+	„
$K_2\,SO_4$	++	erhitzt	—	
$Na\,NO_3$	(+)		++	

Satory ist der Ansicht, daß die dabei frei vorhandenen Ionen (Kationen), maßgebend für den Ausfall der Reaktion sind.

Biedermann und Jernakoff schließen aus den Ergebnissen ihrer eigenen und den in der Literatur erwähnten Versuchen, daß die Leichtmetalle, — und zwar Alkali- und Erdalkalimetalle, — in demselben Sinne wie das Eisen oder die Schwermetalle eine katalytische Anregung der Reaktionen bewirken (5).

Die Wirkung von Jodsalzen zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle von Neumann (gekürzt).

System	Oxydase (Indophenol)	Peroxydase (Benzidin)
Tinct. jodi	+++	—
Na J (Substanz)	+++	+++
Na J (1% frisch)	+++	+++
Na J ($1:10^3$ frisch)	++	++
Na J ($1:10^4$ frisch)	++	+
Na J ($1:10^5$ frisch)	+	(+)
K J (1% frisch)	—	(+) rot

Von den Anionen kommt nach Györgyi besonders der Phosphorgruppe eine Bedeutung zu.

Zu der Ionentheorie ist folgendes zu bemerken.

Betreffs des Eisens haben wir bei der Peroxydasereaktion der isolierten eos. Granula des Pferdes gesehen, daß selbst eisenfreie Präparate die Benzidinreaktion gaben. Auch Nikolajew (39) zieht aus seinen Versuchen, — er stellte Extrakte von Leukozyten her —, den Schluß, daß der Eisengehalt in keiner Beziehung zur Intensität der Peroxydasereaktion stehe. Außerdem ist wichtig, und auch Staemmler macht diese Einwendung gegen die oben erwähnte Auffassung von Gräff und Katsunuma, daß bei Blausäurevergiftungen, wo nachweislich die Peroxydase und Oxydase nicht geschädigt sind, trotzdem die Atmung der Zelle aufhört. Und diese Atmung soll durch ein Atmungsferment, eben das Eisen, das auch die Oxydationsreaktionen bewirken soll, bedingt sein. Es ist aus den Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungen jedenfalls zu schließen, daß Eisen ein unterstützender, aber nicht der einzige Faktor ist, der die Oxydationsreaktionen veranlaßt.

Zur Ionentheorie als solcher sei gesagt, daß die Ionen zweifellos auf den Verlauf der Oxydase- und Peroxydasereaktion einen Einfluß ausüben. Sie genügen jedoch nicht zur Erklärung der Kinetik der Vorgänge (Loele).

Es sei hier, nach den Ergebnissen der Ionentheorie vom Verfasser die Frage aufgeworfen, ob die $CuSO_4$-Lösung, die Sato als Fixierungsflüssigkeit bei seiner Peroxydasemethode — die, wie er behauptet, allen anderen Peroxydasereaktionen überlegen sei, — anwendet, als indifferente Fixierungsflüssigkeit aufgefaßt werden darf.

D. Lipoidtheorie.

Schon bei Besprechung des chemischen Aufbaues der Leukozytengranula wurde die Bedeutung der Lipoide beim Zustandekommen der Oxydationsreaktion gestreift.

Im Jahre 1912 und 1914 stellte Vernon (66; 67) eine Beeinflußbarkeit der Indophenoloxydase durch Narkotika fest. Da dabei zu gleicher Zeit die Lipoide geschädigt waren, schloß der Autor aus seinen Versuchen, daß die Farbreaktionen von Lipoiden abhängig sind.

Auch Gräff kommt zu dieser Zeit auf Grund seiner Untersuchungen, die jedoch an Geweben stattfanden, zu dem Ergebnis, daß die Indophenolblausynthese an der lipoidhaltigen Oberfläche der Granula vor sich geht.

Klopfer (24) macht wohl zuerst darauf aufmerksam, daß Fett oder Lipoid bei der Indophenolblausynthese rotviolett gefärbt ist, im Gegensatz zum Hellblau der Oxydasereaktion. Diese Feststellung ist später mehrfach bestätigt worden.

Bei den Untersuchungen von Neumann über die Indophenolblaufärbung von Fettkörpern stellte sich nach Ansicht des Autors heraus, daß die Indophenolblausynthese wohl für das Vorhandensein von Oxydasen spricht. Nicht immer jedoch trifft die allgemeine Annahme, daß die violette Reaktion von Fettkörpern scharf von blauen Oxydasegranula getrennt werden kann, zu.

Auch Fiessinger (11—15) beschäftigt sich mit der Lipoidfärbung und dem Ausfall der Oxydase- und Peroxydasereaktion an Blutzellen. Er lokalisiert nach seinen Untersuchungen das Ferment der Oxydase- und Peroxydasereaktion an die lipoidhaltige Außenschicht der Granula, deren übriger Teil aus einem Lipoid-Eiweißkomplex, der auch Eisen enthält, bestehe.

Neue Anschauungen über die Beteiligung von lipoiden Körpern am Aufbau der Leukozytengranula erfahren wir von Sehrt (57). Der histochemische Nachweis wird mittels ausgebauter Färbemethoden durchgeführt. Es gelingt dadurch der Nachweis von Lipoiden in den Eosinophilen, Neutrophilen und

den Mononukleären. Die Lymphozyten sind stets frei von Sudangranulation. Nesterow (38) fand nach einem modifizierten Verfahren von Sehrt, daß neben den Lymphozyten auch die Myeloblasten frei von Lipoidkörnern sind. Durch Prüfung der Löslichkeit der Granula gelangt Sehrt zu dem Schluß, daß es sich um Zerebroside und Phosphatide handle. Durch Vergleich der Zahl der Zellen mit starker Oxydasegranulation und solcher mit Sudankörnelung zieht der Autor bei weitgehender Berücksichtigung der Untersuchungen von Neumann über die Natur der eos. Granula den Schluß, daß das für die Oxydasereaktion Maßgebende lipoidartiger Natur ist. Weitere Untersuchungen an den weißen Blutkörperchen der myeloischen Reihe betreffs der Frage, welcher chemische Stoff den Hauptteil der Oxydasegranula ausmacht, ergaben außer den bereits erwähnten Ergebnissen folgendes:

Löst man das Lipoid der Granula, so ist die Oxydasereaktion nicht mehr möglich. Es ist daher nach Sehrts Ansicht für die Zellatmung, als deren Ausdruck er die positive Indophenolblausynthese ansieht, unbedingt nötig. Daher komme den Lipoiden eine wichtige biochemische Bedeutung zu.

Aus neueren Versuchen folgert der Autor, daß das Lipoid intrazelluläres Eisen erst als Katalysator wirksam macht.

Im Gegensatz zu den gesamten bisherigen Forschungsergebnissen steht Carminati (8). Nach seinen Untersuchungen finden sich zwar die sudanophilen Granula auch in den polymorphkernigen Leukozyten und niemals in den Lymphozyten, jedoch sind die von ihm dargestellten Granula nicht identisch mit den neutro- und eosinophilen Körnelungen. Nach Ansicht von Carminati ist der positive Ausfall der Methode von Sehrt nicht beweisend für das Vorhandensein von Lipoiden.

Durch Vergleichszählungen zwischen den nach seiner Methode und panoptisch nach Giemsa gefärbten Ausstrichen kommt Carminati zu dem Schluß, daß nur 1,1% der polymorphkernigen Leukozyten beim gesunden Menschen zahlreiche durch seine Methode darstellbaren Granula enthalten, dagegen 95,4% der Leukozyten gar keine. Es fanden sich auch bei Carminati keine Beziehungen in der Prozentzahl der oxydasepositiven Zellen zu den von diesem Autor dargestellten sudanophilen Zellen.

Gleichfalls für einen Unterschied zwischen Lipoid- und Oxydasegranula tritt ein Landsmann von Carminati ein. Auch Magri (29) schließt aus seinen Untersuchungen, daß Oxydase- und sudanophile Granula ganz verschiedene, von einander unabhängige Dinge sind.

Mit Ausnahme der italienischen Forschungen, die nirgends bestätigt wurden, und der Ansicht von Sehrt, die weiter unten erwähnt ist, können die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen dahin zusammengefaßt werden, daß die Granula an der Außenfläche ihrer Lipoidhülle ein Ferment enthalten, das die Farbreaktionen gibt. Der gebildete Farbstoff wird dann an die Lipoidhülle der Granula adsorbiert.

Sehrt schließt auf Grund seiner Untersuchungen, daß die Lipoide bei der Oxydasereaktion das Eisen als Katalysator aktivieren, welches dann die Indophenolblausynthese bewirkt.

Es gelten gegen die Theorie von Sehrt, wegen der Beteiligung des Eisens, dieselben Einwendungen, die schon bei der Besprechung der Ionentheorie geäußert wurden.

E. Aldehydtheorie.

Der Vervollständigkeit halber sei bei der Besprechung der die Oxydationsreaktionen bewirkenden Körper zum Schluß die Aldehydtheorie von Loele angeführt.

Nach Loele ist in den Leukozytengranulationen wahrscheinlich ein Aldehydfaktor vorhanden, der mit der Farbstoffbildung in Beziehung steht. Loele stützt sich dabei auf den Befund von Weiß, der in den eos. Leukozytengranula, wo auch ohne Formolfixierung die Naphtolreaktion positiv ausfällt, eine Aldehydgruppe nachgewiesen hat. Weiter scheint dem Autor die Tatsache auffällig, daß durch die Einwirkung von Aldehyden die Naphtolreaktion verstärkt wird.

Zu Beginn dieses Kapitels wurde die Frage aufgeworfen, ob die von manchen Forschern als Atmungskörper anzusehenden Oxydasen und Peroxydasen in den Leukozytengranulationen des Menschen nachgewiesen worden sind. Dazu ist folgendes zu sagen:

Wenn uns die Ergebnisse der Untersuchungen über andere Granula, z. B. die eos. Körnelungen des Pferdes, auch wichtige Beiträge zur Frage der intrazellulären Indophenolblausynthese überhaupt geliefert haben, so ist auf Grund der bisherigen Forschungen festzustellen:

1. Der vollkommen einwandfreie Beweis, daß die Leukozytengranula des Menschen wirklich Träger von Oxydasen und Peroxydasen sind, ist bisher noch nicht geführt.
2. Über die chemische Beschaffenheit der Oxydasen und Peroxydasen ist trotz vieler Untersuchungen nichts Näheres bekannt.

Wieweit die in den vorausgehenden Zeilen erwähnten Vorstellungen betreffs der Wirkungen der die Oxydationsreaktionen bedingenden Stoffe den tatsächlichen Vorgängen Rechnung tragen, ist ungewiß. Zweifellos haftet dieser Gruppe von Methoden als Nachteil die Unsicherheit an, in welcher Weise die gemessenen Vorgänge mit dem physiologischen Atmungsmechanismus der Zellen verknüpft sind (26).

Das Ergebnis der Untersuchungen der chemischen Struktur der Leukozytengranula, an denen sich die Oxydationsreaktionen ja abspielen, war die Feststellung, daß hier ein höchst kompliziert gebauter Körper vorliegt, und daß wahrscheinlich mehrere Stoffe am Zustandekommen der Farbreaktionen beteiligt sind. Der ganze Fragekomplex, ob Ferment, Lipoid oder Eisen, ist doch noch zu wenig erforscht, als daß man sich zu einer Stellungnahme für e i n e n der Körper entschließen könnte.

III. Zentralnervöse Regulation des Blutbildes.

Das striäre Blutsyndrom.

Die zentralnervöse Blutregulation, die von Hoff (22, 23) eingehend beschrieben wurde, sei wegen ihrer Beziehungen zum „striären Blutsyndrom" und damit zur Frage des verschiedenen Ausfalles der Oxydasereaktion gegenüber der Peroxydasereaktion an dieser Stelle erwähnt.

Es seien zuerst die Ergebnisse verschiedener Versuche beschrieben.

Durch Einstich in die Gegend der Zellanhäufungen des Corpus striatum, des Thalamus und Hypothalamus konnte Rosenow ausgesprochne Leukozytosen erzielen.

Infolge Luftfüllung der Ventrikel zwecks Enzephalographie hat Hoff beim Menschen Leukozytosen in so erheblichem Maße beobachtet, wie sie sonst nur bei akuten Infektionskrankheiten auftreten.

Nach Durchschneidung des Halsmarkes bei Tieren bleibt die sonst regelmäßig auslösbare Leukozytose nach Injektion von Bakterienstoffen aus (Hoff und Linhard).

Nach diesen Untersuchungen ist es wahrscheinlich, daß im Hirnstamm, insbesondere in der Umgebung des dritten Ventrikels, vegetative Zentren liegen, die für das Blutbild von Bedeutung sind.

Weitere Beobachtungen ergaben, daß auch Leukozytosen bei Herderkrankungen des Gehirns auftreten, die nicht im Zwischenhirn lokalisiert sind. Auch stellte man Veränderungen des weißen Blutbildes beim epileptischen Anfall, bei psychischen Krankheitsbildern, paralytischen Anfällen, bei Delirium tremens und Schizophremie fest.

Ob für die Entstehung eigentlicher Blutkrankheiten, z. B. der Leukämien, auch Herderkrankungen im Hirnstamm eine Rolle spielen, ist noch eine Frage. Es können ja auch die wenigen Beobachtungen (Rosenow und Sieber) so gedeutet werden, daß die zerebralen Herderkrankungen Folgen der Leukämien waren.

Die Veränderungen des weißen Blutbildes bei Erkrankungen des Corpus striatum werden im folgenden Abschnitt eingehender geschildert.

Das striäre Blutsyndrom.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, sollen in dieser Arbeit die Oxydase- und Peroxydasemethode bezüglich ihres prozentualen Ausfalles miteinander verglichen werden, und zwar an Hand von Blutausstrichen leukämischer Kranker. Einen Unterschied im Ergebnis beider Reaktionen, die sonst immer einander parallel gehen, finden wir bei bestimmten Erkrankungen, wie Parkinson, Chorea minor und Encephalitis lethargica. Blutausstriche solcher Patienten zeigen z. T. bei positiver Oxydasereaktion eine negative Peroxydasefärbung. Nach dem Japaner Sato wurde dieses Merkmal als „striäres Blutsyndrom" — Streifensymptom — bezeichnet. Als Ursache nämlich dieses Symptoms nahm der japanische Autor eine Schädigung des Corpus striatum an, das er als zentral regulierendes Organ für den Peroxydasegehalt der Leukozyten ansah.

Verf. versuchte nun, möglichst viele Fälle mit striären Blutsyndrom in der Literatur ausfindig zu machen, in der Hoffnung, in den Berichten über die Krankheitsfälle vielleicht einen Hinweis mit für die Erklärung der Ergebnisse auch seiner Untersuchungen zu finden.

Im Jahre 1922 und 1925 stellten zwei japanische Forscher, Sato und Yoshimatsu (49), mit Hilfe einer eigenen Peroxydasemethode (s. S. 17) fest, daß der Ausfall dieser Farbreaktion an den granulierten weißen Blutzellen bei bestimmten Krankheiten negativ war, während die Oxydasefärbung an denselben Zellen positive Ergebnisse aufwies. Bei den Erkrankungen handelte es sich um typische Fälle von epidemischer Enzephalitis. Der negative Ausfall der Peroxydasereaktion gilt besonders für die frische Erkrankung, in der Rekonvaleszenz wird die Reaktion wieder positiv. Tierexperimente lassen die Kontrollregion für die Peroxydasereaktion in die Corpora striata lokalisieren, die Entzündung dieser Gegend, wie sie für Enzephalitis typisch ist, oder ihre Verletzung rufen die negative Reaktion hervor.

In einer späteren Arbeit (1926), die Sato mit Sekiya (50) veröffentlicht, schränkt er die in früheren Arbeiten aufgestellten Behauptungen etwas ein und erklärt, daß die von ihm erfundene Peroxydasemethode bei akuter Enzephalitis entsprechend der Schwere der Infektion schlecht angeht. Ein positiver Ausfall der Reaktion spräche für eine günstigere Prognose. Außerdem sei das negative Ergebnis der Methode nicht nur für die obenerwähnten Krankheiten spezifisch. Auch bei septischen Infektionen stellte sein Landsmann Ohara einzelne peroxydasenegative Leukozyten fest.

Shoji (59) erwähnt in einer Arbeit vom Jahre 1927 die obenbeschriebenen Forschungen und berichtet von dem am Kaninchen ausprobierten „Peroxydase-Stich", der eine gleiche Wirkung auf das Blutbild hervorruft wie die akute, schwere Enzephalitis.

Im Jahre 1930 beschrieben Sato und Tokué (52) das erste physiologische Analogon zu dem striären Blutsyndrom. Und zwar zeigten die basophilen Blutzellen des Meerschweinchens regelmäßig positive Oxydase-, jedoch negative Peroxydasereaktion. Auch die weißen Blutzellen eines Mollusken (Arca inflata Reeve) wiesen ein schwaches, die von Candina Milensis das vollständige Streifensymptom auf.

Eine Bestätigung erfahren die Untersuchungen von Sato und Yoshimatsu durch einen von Simmel (60) berichteten Krankheitsfall. Die von diesem Autor beobachtete Patientin erkrankte zum ersten Mal im Alter von 8 Jahren an Chorea minor. Das letzte Rezidiv, es traten mehrere auf, wurde im Alter von 27 Jahren beobachtet. Bei dieser Gelegenheit wurde der negative Ausfall der Peroxydasereaktion bei positiver Oxydasemethode festgestellt. Nach Abklingen der Chorea wurde die Peroxydasereaktion positiv. Ein Jahr nach dem letzten Rezidiv wurde anläßlich eines tödlichen Unfalles die Sektion vorgenommen; es wurde dabei hochgradige Degeneration der Ganglienzellen im Corpus striatum und Nucleus ruber festgestellt.

Das striäre Blutsyndrom der Japaner wurde von Satorius an Hand von 23 Fällen geprüft. Dabei fanden sich neben 9 Kontrollfällen 10 Kinder mit extrapyramidalen Symptomen und 4 Parkinsonfälle. Bei allen 23 Fällen war die Peroxydasereaktion positiv. Nach Ansicht von Satorius (53) kann den Befunden der Japaner keine klinische Bedeutung beigemessen werden.

Mascher (30), der selbst über das Streifensymptom gearbeitet hat, beschäftigt sich eingehend in einem Aufsatz mit den Untersuchungen von Sato und der von diesem Autor aufgestellten Theorie.

Nach dieser Theorie gibt es ein Zentrum zur Regulierung des Peroxydasegehaltes in den myeloischen Leukozyten. Dieses liegt nach Tierversuchen bilateral am Boden des dritten Ventrikels in der grauen Substanz der Gegend der Oculomotoriuskerne. Traumatische (Peroxydase-Stich) oder entzündliche Verletzung rufen das striäre Blutsyndrom hervor.

Im normalen Zustand ist das Peroxydasezentrum in Tätigkeit und reguliert auf dem Innervationswege ein peroxydaseproduzierendes Organ (oder mehrere Organe), welches Peroxydaseferment in die Blutbahn sezerniert. Die myeloischen Leukozyten des strömenden Blutes nehmen dieses Ferment auf und verlieren es wieder bei ihrer aktiven Tätigkeit in den Kapillargebieten. Dieser Verlust wird jedoch sofort wieder aus den Peroxydasen des Blutes ersetzt, so daß es sehr unwahrscheinlich ist, daß man ihn durch die Peroxydasereaktion nachweisen könnte. Aber sobald das fermentsezernierende Organ seine Tätigkeit einstellt, wird das Blut immer ärmer und ärmer an Peroxydasen werden, bis den Leukozyten kein Ferment mehr zur Verfügung steht. Alle myeloischen Zellen werden dann peroxydasenegativ werden. Was die Knochenmarkszellen anbetrifft, die zum mindesten nicht ebenso stark aktiv sind wie die des strömenden Blutes, so behalten sie ihre Peroxydasen nach wie vor, selbst wenn die des strömenden Blutes schon alle negativ geworden sind.

Zum Beweis dieser Theorie versuchten Sato und Suzuki das fermentproduzierende Organ zu exstirpieren. Sie führten zu diesem Zweck stark Peroxyde aufnehmende Substanzen in die Blutbahn ein, so daß dann den Leukozyten kein Ferment mehr zur Verfügung stände.

Der Versuch fiel jedoch negativ aus!

Mascher schildert dann die Ergebnisse seiner eigenen Untersuchungen mit dem striären Blutsyndrom an 40 Fällen chronischer Enzephalitis. Es war kein einziger Fall darunter, den man im Sinne von Sato als positiv hätte bezeichnen können. Nur bei einem schwersten Fall fand sich deutlich eine Abschwächung des Peroxydasegehaltes der myeloischen Leukozyten, die man als ein dem Streifensymptom verwandtes Phänomen auffassen könnte. Die übrigen 39 Fälle zeigten Schwankungen innerhalb der Norm.

Weitere Beobachtungen über das Streifensymptom finden wir in der italienischen Literatur.

Berlucchi fand in 50 Fällen von Erkrankungen des Zentralnervensystems (von denen ein Teil durch Läsionen des Striatum gekennzeichnet war) mit der Oxydase- und Peroxydasereaktion normale Befunde (43).

Ebenso zeigte die Peroxydasereaktion, die Ganfini in 5 Fällen von Chorea minor und 16 Fällen von postenzephalitischem Symptomkomplex anwandte, stets positive Ergebnisse (45).

Calzavara beobachtete das striäre Blutbild von Sato in je 2 Fällen von postenzephalitischem Parkinsonismus und Schizophrenie, weiter in einem Fall von Chorea minor. Experimentell konnte in zwei Fällen bei Hähnen durch Bulbocapnin-Vergiftung das Streifensymptom erzeugt werden. Calzavara hält das striäre Blutsyndrom nicht spezifisch für Striatusläsionen und das Bestehen eines Peroxydasezentrums im Zentralnervensystem nicht für bewiesen (44).

Zusammenfassend kann folgendes gesagt werden.

Durch Untersuchungen von Hoff und anderer Forscher ist einwandfrei bei Erkrankungen eine Beeinflussung des Blutbildes vom Zentralnervensystem festgestellt worden.

Bestimmte Infektionskrankheiten, die wohl mit einer Schädigung des Corpus striatum einhergehen, zeigten in einigen Fällen bei positiver Oxydasereaktion einen negativen Ausfall der Peroxydasereaktion. Die z. T. sich widersprechenden Beobachtungen glaubt Verf. so zu erklären, daß wahrscheinlich das striäre Blutsyndrom nur im akuten Stadium bei schweren Fällen, wenn beide Corpora striata ergriffen sind, beobachtet werden kann.

In Berücksichtigung der Ergebnisse von Hoff kann man das Streifensymptom von Sato wohl nur als eine, bei gewissen Krankheiten beobachtete, besondere Reaktion bestimmter Gehirnabschnitte bezeichnen. Wie aus den Untersuchungen von Ohara und anderen Forschern hervorgeht, ist das striäre Blutsyndrom nicht für die enzephalitischen Erkrankungen spezifisch. Es kann in abgeschwächter Form auch bei schweren Infektionskrankheiten, besonders Sepsis, auftreten.

Weiter wurde eine deutliche Abschwächung der Peroxydasereaktion bei positiver Oxydasereaktion von Suzuki als Frühsymptom der B-Avitaminose beobachtet.

Ob für Leukämien Herderkrankungen im Gehirn verantwortlich gemacht werden können, ist bisher noch nicht erwiesen.

IV. Oxydase- und Peroxydasereaktion bei Leukämien.

In dem vorausgehenden Kapitel haben wir gesehen, daß die Peroxydasereaktion gegenüber der Oxydasemethode bei bestimmten Erkrankungen quantitative und qualitative Unterschiede im Ausfall der positiven Zahl der Zellen aufweist.

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen behandeln an Hand von 20 leukämischen Erkrankungen, von denen 16 myeloischer und 4 lymphati-

scher Natur waren, die Frage, ob bei leukämischen Blutbildern der prozentuale Anteil der oxydasepositiven Zellen gleich dem der peroxydasepositiven ist.

Die Oxydasemethode, die bei diesen Versuchen angewandt würde, ist eine Modifikation der Reaktion von Winkler-Schultze; sie ist an der hallischen Klinik seit längerer Zeit im Gebrauch.

Fixation

der gut lufttrockenen Ausstriche für 15 Sekunden in 1% Osmiumsäure. Dann 5 Minuten in gewechseltem Wasser (es wurde Leitungswasser benutzt) gründlich spülen. —

Da die Blutausstriche bei der sonst üblichen Fixierung in Alkohol-Formol mit stark sauerstoffhaltigem Material (Formol) vor Ausführung der Oxydasereaktion in Berührung kommen, wurde als Fixationsmittel Osmium-Säure benutzt, um damit Fehlerquellen auszuschalten. Auch Neumann erwähnt diesen Punkt in seiner Arbeit (36: 37) und betont, daß bei der Fixation der Präparate für die Indophenolblausynthese jede Behandlung mit Formol wegen der oben angeführten Gründe vermieden werden müßte.

Oxydasereaktion.

Färbung.

A. 10—15 Minuten in 1% alpha-Naphtollösung.

Herstellung.

0,5 g alpha-Naphtol in

15 ccm absol. Alkohol lösen. Es darf nicht eher aqua dest. ad 50 ccm zugefügt werden, bis das alpha-Naphtol sich vollständig gelöst hat. Beim Hinzufügen des Wassers, besonders wenn dieses kalt ist, kommt es häufig zu einer leichten milchigen Trübung der Flüssigkeit. Diese verschwindet nach einiger Zeit beim Erwärmen, bestimmt jedoch beim Zusatz von

0,15 ccm NH_3 conc. Bleibt die Trübung auch dann noch bestehen, so waren die Reagentien oder Gläser unsauber. Eine getrübte alpha-Naphtollösung darf nicht zur Färbung benutzt werden.

Nachdem die Präparate für 10—15 Minuten in der Flüssigkeit waren, ohne abzuspülen.

B. 10—15 Minuten in 1% Dimethylparaphenylendiamin-Lösung.

Herstellung.

0,5 g Dimethylparaphenylendiamin in

50,0 ccm aqua dest. lösen. Die Lösung muß vor Gebrauch filtriert werden.

Gegenfärbung.

1—5 Sekunden mit verdünnter Fuchsinlösung.

Ergebnis.

Die Leukozyten sind prall gefüllt mit tiefblauen Granula. Die Kerne zeigen ein kräftiges Rot. Deutlich sind die Zellen mit rotem Kern ohne jede Granulation als negative Formen (Lymphozyten, z. T. Meyeloblasten), von den positiven, blau gekörnten Zellen zu unterscheiden.

Es wurde bei genauer Einhaltung der oben angegebenen Methode und bei Benutzung sauberer Reagentien kein Versagen der Farbreaktion beobachtet.

Als Peroxydasereaktion wurde eine etwas abgeänderte Grahamsche Methode in Anwendung gebracht. Schon Mielke (31) hatte an Hand von Untersuchungen festgestellt, daß die verschiedenen „Grade" der Peroxydasereaktion von Graham durch technische Faktoren hervorgerufen werden und bei genügend langer Färbezeit verschwinden. Auch Verf. konnte bei Anwendung der an der Medizinischen Klinik in Halle a. S. gebräuchlichen Peroxydasemethode die verschiedenen Grahamformen nicht beobachten.

Peroxydasereaktion.

Fixierung.

5—7 Minuten in Alkohol-Formol.

Herstellung: 9 Teile 94% Alkohol.
1 Teil Formol conc.
Gründlich mit aqua dest. spülen.

Die bei der Oxydasemethode erhobenen Bedenken gegen das Formol als Fixierungsflüssigkeit können bei der Peroxydasereaktion fallen gelassen werden, wie vergleichende Untersuchungen bei Fixierung mit Osmiumsäure ergaben. Die Anwendung von Formol hat auf die spätere Farbreaktion keinen Einfluß, denn es wird ja extra dem Benzidin ein Peroxyd zugesetzt, damit unter Einwirkung einer „Peroxydase" sich der Farbstoff bilden kann.

Färbung.

10—15 Minuten in Benzidin-Wasserstoffsuperoxyd-Lösung.

Herstellung.

In 20 ccm 40% Alkohol einige Körnchen Benzidin durch kräftiges Schütteln lösen; filtrieren. Zum Filtrat 6 Tropfen 3% H_2O_2 (frisch!).

Gegenfärbung.

10—15 Sekunden mit Anilinwasserthionin.

Ergebnis.

Die Leukozyten sind dicht gefüllt mit gelbbraunen Körnelungen. Die Kerne sind blau gefärbt. Auch bei Anwendung dieser Methode sind infolge der Farbunterschiede zwischen den Granula und dem Kern die negativen Zellen deutlich von den positiven zu trennen.

Die Peroxydasereaktion hat den Vorzug, daß sie schneller und technisch einfacher auszuführen ist als die Oxydasemethode: außerdem ist sie billiger.

Ein Nachteil der Benzidinmethode besteht darin, daß die H_2O_2-Lösung frisch sein muß. Als Verf. die beiden Farbreaktionen erst einmal an Blutausstrichen von Gesunden ausführte, bemerkte er eine Abschwächung des Ausfalles der Benzidinmethode beim Gebrauch älterer H_2O_2-Lösungen. Für die Färbung der leukämischen Blutausstriche wurde daher die 3% H_2O_2-Lösung jedesmal aus einer 30% Perhydrollösung frisch angesetzt: es war dadurch ein einwandfreies Arbeiten mit der Methode möglich.

Nur einmal versagte die Benzidinreaktion, und zwar trat bei einem Versuch eine Bläuung der Benzidin-H_2O_2-Lösung auf. Als Ursache wurde dann eine Verunreinigung des Benzidins festgestellt.

Bezüglich der Qualität beider Färbemethoden ist nochmals zu betonen, daß die Benzidinmethode der Nadifärbung, wie Verf. an Hand von Untersuchungen bei Beginn seiner Arbeit (s. oben) feststellte, bei Blutausstrichen Gesunder völlig parallel geht.

Den Ausfall der Oxydase- wie Peroxydasereaktion an den 20 untersuchten leukämischen Blutausstrichen zeigen die folgenden Tabellen.

Zur Frage der Zahl der ausgezählten Zellen ist zu bemerken, daß vom Differenzblutbild, - nach Pappenheim gefärbt, — durchschnittlich 200 Zellen ausgezählt wurden.

Bei den der Oxydase- und Peroxydasemethode ausgesetzten Blutausstrichen wurden je 1000 Zellen ausgezählt! Der Grund war folgender.

Bei jedem Blutausstrich ist bei mehrfacher Auszählung von je 100 Zellen eine durch Zufälligkeiten bestimmte Schwankungsbreite in der Art der Zusammensetzung der weißen Blutzellen zu beobachten. Um bei einem Vergleich zweier Färbemethoden so keinem Trugschluß zu erliegen, wurde durch Auszählung einer großen Zahl von Zellen die erwähnte Schwankungsbreite wohl auf ein Mindestmaß herabgedrückt.

	Gräf, Gertrud 28 J. 26. XII. 35	Kannabei, Berta 33 J. 30. XII. 35	Kannabei, Berta 33 J. 20. XII. 35
Hb.:	33%	—	55 %
Erythr.:	1 650 000	—	3 320 000
Leukoc.:	20 000	140 000	15 800
Myeloblasten:	24%	6 %	—
Pro-Myelozyten:	23%	4 %	—
N.Myelozyten:	5%	24 %	7 %
Eos. Myelozyten:	—	1 %	—
Bas.Myelozyten:	—	2 %	—
N. Metamyelozyten:	—	12 %	11 %
Eos. Metamyelozyten:	—	—	—
Bas. Metamyelozyten:	—	—	—
N. stabkernige L.:	3%	14 %	17 %
N. segm. L.:	7%	32 %	55 %
Eos. segm. L.:	—	1 %	1 %
Bas. segm. L.:	—	3 %	3 %
Monozyten:	—	1 %	1 %
Kl. Lymph.:	36%	—	4 %
Gr. Lymph.:	2%	—	1 %
Oxydasepositive Zellen:	36%	91,0%	93,2%
Schwachpositive Zellen:	1%	—	—
Oxydasenegative Zellen:	63%	9,0%	6,8%
Peroxydasepositive Zellen:	24%	84,5%	89,0%
Schwachpositive Zellen:	2%	4,0%	—
Peroxydasenegative Zellen:	74%	11,5%	11 %

	Greye, Franz 24 J. 2. XII. 35	Greye, Franz 14. V. 36	Buchsteiner, Horst 14 J. 19. II. 36	Machon, Ilse 14 J. 2. III. 36
Hb.:	50 %	61 %	29 %	66 %
Erythr.:	2 860 000	3 580 000	1 190 000	3 680 000
Leukoc.:	177 000	109 000	179 200	137 600
Myeloblasten:	1 %	1 %	7 %	88 %
Pro-Myelozyten:	5 %	3 %	15 %	4 %
N-Myelozyten:	44 %	24 %	25 %	0,5%
Eos. Myelozyten:	1 %	—	1 %	—
Bas. Myelozyten:	—	—	—	—
N. Metamyelozyten:	11%	22 %	18 %	—
Eos. Metamyelozyten:	—	—	—	—
Bas. Metamyelozyten:	—	—	—	—
N. stabkernige L.:	9 %	8 %	6 %	0,5%
N. segm. L.:	20 %	25 %	17 %	2 %
Eos. segm. L.:	1 %	5 %	1 %	—
Bas. segm. L.:	2 %	5 %	—	—
Monozyten:	—	1 %	—	—
Kl. Lymph.:	6 %	6 %	10 %	5 %
Gr. Lymph.:	—	—	—	—
Oxydasepositive Zellen:	91,5%	87,9%	84,5 %	4,7%

	Greye, Franz 24 J. 2. XII. 35	Greye, Franz 14. V. 36	Buchsteiner, Horst 14 J. 19. II. 36	Machon, Ilse 14 J. 2. III. 36
Schwachpositive Zellen:	—	0,9%	—	—
Oxydasenegative Zellen:	8,5%	11,2%	15,5 %	95,3%
Peroxydasepositive Zellen:	91,0%	83,4%	85,75%	5 %
Schwachpositive Zellen:	—	1,0%	—	—
Peroxydasenegative Zellen:	9,0%	15,6%	14,25%	95 %

	Röhrich, Selma 37 J. 6. II. 36	Lohse, Herbert 22 J. 5. V. 36	Hildebrand, Hedwig 54 J. 27. VIII. 36	Meyer 52 J. 5. IX. 36
Hb.:	69 %	37 %	47 %	42 %
Erythr.:	4 100 000	1 960 000	2 230 000	2 030 000
Leukoc.:	60 000	223 200	110 400	388 800
Myeloblasten:	2 %	5 %	74 %	7 %
Pro-Myelozyten:	7 %	16 %	2 %	11 %
N. Myelozyten:	12 %	12 %	2 %	24 %
Eos. Myelozyten:	—	—	—	2 %
Bas. Myelozyten:	—	—	—	5 %
N. Metamyelozyten:	13 %	29 %	1 %	19 %
Eos. Metamyelozyten:	—	—	—	1 %
Bas. Metamyelozyten:	—	—	—	—
N. stabkernige L.:	19 %	10 %	—	14 %
N. segm. L.:	42 %	20 %	4 %	15 %
Eos. segm. L.:	1 %	1 %	—	—
Bas. segm. L.:	—	1 %	—	—
Monozyten:	1 %	1 %	1 %	—
Kl. Lymph.:	3 %	5 %	16 %	2 %
Gr. Lymph.:	—	—	—	—
Oxydasepositive Zellen:	93,4%	89,2%	18,1%	90,5%
Schwachpositive Zellen:	2,3%	0,8%	6,1%	—
Oxydasenegative Zellen:	4,3%	10,0%	75,8%	9,5%
Peroxydasepositive Zellen:	90,0%	83,3%	14,0%	87,9%
Schwachpositive Zellen:	1,5%	6,6%	5,1%	—
Peroxydasenegative Zellen:	8,5%	16,1%	80,9%	12,1%

	Schulday, Robert 31 J. 10. IX. 36	Betge, Anna 49 J. 21. IX. 36	Wobst, Gertrud 28 J. 30. XI. 36	Wobst, Gertrud 30. XI. 36
Hb.:	74 %	20 %	33 %	—
Erythr.:	4 820 000	605 000	1 130 000	—
Leukoc.:	44 000	7 800	196 000	—
Myeloblasten:	—	2 %	62 %	—
Pro-Myelozyten:	3 %	3 %	—	—
Mikromyeloblasten	—	—	33 %	—
N. Myelozyten:	14 %	9 %	—	—
Eos. Myelozyten:	—	1 %	—	—

	Schulday, Robert 31 J. 10. IX. 36	Betge, Anna 49 J. 21. IX. 36	Wobst, Gertrud 28 J. 30. XI. 36	Wobst, Gertrud 30. XI. 36
Bas. Myelozyten:	—	—	—	—
N. Metamyelozyten:	13 %	9 %	—	—
Eos. Metamyelozyten:	—	—	—	—
Bas. Metamyelozyten:	—	—	—	—
N. stabkernige L.:	31 %	42 %	1 %	—
N. segm. L.:	30 %	18 %	2 %	—
Eos. segm. L.:	2 %	2 %	—	—
Bas. segm. L.:	1 %	—	—	—
Monozyten:	—	1 %	—	—
Kl. Lymph.:	4 %	12 %	2 %	—
Gr. Lymph.:	2 %	1 %	—	—
				Im Knochenmarkpunktat
Oxydasepositive Zellen:	91,4 %	86,0 %	3,8 %	0,8 %
Schwachpositive Zellen:	3,0 %	0,4 %	—	—
Oxydasenegative Zellen:	5,6 %	13,6 %	96,2 %	99,2 %
Peroxydasepositive Zellen:	87,9 %	82,0 %	3,2 %	0,2 %
Schwachpositive Zellen:	2,7 %	0,8 %	—	1,0 %
Peroxydasenegative Zellen:	9,4 %	17,2 %	96,8 %	98,8 %

	Marzinak, Joseph 72 J. 30. XI. 36	Teuscher, Gertrud 47 J. 18. XII. 36	Krause, Gertrud 35 J. 8. I. 37	Neitzel, Ida 54 J. 1. II. 37
Hb.:	69 %	71 %	62 %	76 %
Erythr.:	3 330 000	3 330 000	3 110 000	3 400 000
Leukoc.:	132 000	197 000	113 000	176 000
Myeloblasten:	3 %	1 %	—	1 %
Pro-Myelozyten:	9 %	4 %	1 %	3 %
N. Myelozyten:	17 %	18 %	3 %	3 %
Eos. Myelozyten:	1 %	1 %	—	1 %
Bas. Myelozyten:	2 %	2 %	—	1 %
N. Metamyelozyten:	20 %	34 %	22 %	16 %
Eos. Metamyelozyten:	—	1 %	—	1 %
Bas. Metamyelozyten:	—	1 %	—	1 %
N. stabkernige L.:	20 %	15 %	45 %	26 %
N. segm. L.:	19 %	16 %	23 %	41 %
Eos. segm. L.:	1 %	2 %	—	—
Bas. segm. L.:	1 %	3 %	1 %	1 %
Monozyten:	1 %	—	1 %	1 %
Kl. Lymph.:	2 %	2 %	3 %	1 %
Gr. Lymph.:	4 %	—	1 %	3 %
Oxydasepositive Zellen:	85,7 %	90,2 %	93,9 %	91,0 %
Schwachpositive Zellen:	0,8 %	—	0,5 %	0,3 %
Oxydasenegative Zellen:	13,5 %	9,8 %	5,6 %	9,7 %
Peroxydasepositive Zellen:	81,3 %	88,5 %	94,0 %	89,3 %
Schwachpositive Zellen:	2,2 %	—	0,4 %	0,3 %
Peroxydasenegative Zellen:	16,5 %	11,5 %	5,6 %	10,4 %

	Och, Wilhelm 56 J. 17. XII. 35	Anders, Eduard 67 J. 25. VI. 36	Hohmann, Minna 59 J. 31. VIII. 36	Wernecke, Martin 51 J. 7. IX. 36
Hb.:	75 %	71 %	62 %	65 %
Erythr.:	4 120 000	3 900 000	2 880 000	2 200 000
Leukoc.:	74 000	66 800	58 800	158 800
Myeloblasten:	—	—	—	—
Pro-Myelozyten:	—	—	—	—
N. Myelozyten:	—	—	—	—
Eos. Myelozyten:	—	—	—	—
Bas. Myelozyten:	—	—	—	—
N. Metamyelozyten:	—	—	1 %	—
Eos. Metamyelozyten:	—	—	—	—
Bas. Metamyelozyten:	—	—	—	—
N. stabkernige L.:	—	—	1 %	0,3 %
N. segm. L.	4 %	5 %	3 %	1,7 %
Eos. segm. L.:	1 %	—	1 %	—
Bas. segm. L.:	1 %	—	—	—
Monozyten:	—	—	—	—
Kl. Lymph.:	82 %	93 %	87 %	84 %
Gr. Lymph.:	12 %	2 %	7 %	10 %
Jugendl. Lymph.:	—	—	—	4 %
Oxydasepositive Zellen:	5,9 %	4,4 %	4,8 %	1.7 %
Schwachpositive Zellen:	—	—	—	0,2 %
Oxydasenegative Zellen:	94,1 %	95,6 %	95,2 %	98.1 %
Peroxydasepositive Zellen:	4,7 %	3,7 %	3,8 %	2.0 %
Schwachpositive Zellen:	—	—	—	0,2 %
Peroxydasenegative Zellen:	95,3 %	96,3 %	96,2 %	97.8 %

Über das Ergebnis der vergleichenden Untersuchungen ist folgendes zu sagen.

Die Oxydasemethode zeigt sich der Peroxydasefärbung bei ihrer Anwendung an Blutausstrichen myeloischer Leukämien leicht überlegen.

Es wird angenommen, daß in dem „Grad der Reife" der Zellen die Ursache des verschiedenen Ausfalles der beiden Reaktionen zu suchen ist. Und zwar geben die Myeloblasten die Oxydasereaktion nur zum Teil, wie man deutlich an den lockeren, rot gefärbten Kernen der großen Zellen ohne Granula erkennen kann.

Einzelne Myeloblasten, immer dagegen wohl die Promyelozyten und Myelozyten, sind sicher oxydasepositiv.

Von der Peroxydasefärbung ist betreffs der Myeloblasten zu sagen, daß sie an diesen Zellen meistens negativ ausfällt. Jedoch gibt es, wie bei allen biologischen Methoden, auch hier Ausnahmen (Buchsteiner, Hildebrand).

Weiter geht aus den Versuchen einwandfrei hervor, daß auch die Promyelozyten z. T. die Benzidinreaktion nicht geben! (Gräf, Röhrich, Lohse.)

Bei ganz unreifen Zellformen, wie wir sie bei den Myeloblastenleukämien antreffen (Machon, Wobst), versagen beide Methoden in gleich starkem Maße.

Die lymphatischen Leukämien zeigen, da die Lymphozyten ja immer negativ reagieren, bei beiden Methoden die gleiche Zahl negativer Zellen.

Zu dem Ausfall der beiden Oxydationsmethoden an den basophilen Zellen möchte Verf. keine Stellung nehmen, da die Berichte der Japaner

über diese Zellen erst bearbeitet wurden, als die Versuche schon fast abgeschlossen waren. Außerdem wurden nicht genügend Fälle mit einer größeren Zahl basophiler Zellen beobachtet (Kannabei, Greye, Teuscher).

Die Frage, ob die Oxydase- und Peroxydasegranula mit den durch die Pappenheimmethode darstellbaren Körnelungen in Beziehung stehen, ist zu bejahen. Wenn nun die durch die verschiedenen Methoden sichtbar gemachten Granula auch nicht immer in ihrer Form einander gleichen (Farbgranula plumper), so ist daran zu denken, daß es nach Bildung des Farbstoffes durch bestimmte in oder an den Granulationen vorkommende Stoffe wahrscheinlich zu dessen Adsorption an die Körnelungen kommt. Es ist anzunehmen, daß durch diesen „Farbmantel" die Körnchen größer werden; auch können sie dadurch so dicht an einander zu liegen kommen, daß dann mehrere von ihnen als ein Gebilde in Erscheinung treten.

Es wurde im Verlauf dieser Arbeit eingehend geschildert, welche Stoffe bei den normalen weißen Blutzellen wahrscheinlich die Oxydase- und Peroxydasereaktion bedingen und welche Faktoren sie beeinflussen. Da aber bis jetzt noch nicht einwandfrei festgestellt worden ist, welcher Körper die Oxydationsreaktionen eigentlich bewirkt, kann deshalb auch nicht entschieden werden, ob bei den erwähnten unreifen Formen die die Farbreaktionen bewirkenden Stoffe, Fermente, Ionen oder Lipoide, oder „der Fermentträger", die Lipoidhülle, auf die Peroxydasereaktion schlechter als auf die Oxydasereaktion ansprechen.

Vielleicht bietet auch bei beiden Methoden, besonders aber bei der Benzidinreaktion, die Farblösung, das Substrat, für die jungen Zellen, und erst recht für die jüngsten und unreifsten Formen dem oxydativen Körper nicht die günstigsten Bedingungen (Ph-Wert usw.).

Weiter wäre daran zu denken, daß in den unreifen Zellformen Stoffe vorhanden sind, die auf die beiden Farbreaktionen verschieden hemmend einwirken.

Ob man den Einfluß bestimmter Hirnteile auf den Ausfall der Peroxydasereaktion auch für leukämische Erkrankungen annehmen darf, ist sehr fraglich, da die bisherigen Untersuchungen über diesen speziellen Einfluß nicht allgemein bestätigt wurden.

Schlußbetrachtung.

Zweck und Aufgabe dieser Arbeit war es, die Oxydase- und Peroxydasereaktion bezüglich ihres Ausfalles an leukämischen Blutausstrichen mit einander zu vergleichen. Dazu war jedoch zuerst notwendig, zu untersuchen, an welchen Teilen der Zellen die Farbreaktionen sich abspielen. Nach dem Ergebnis der bisherigen Forschungen stehen die Oxydase- und Peroxydasegranula in engen Beziehungen zu den durch die Pappenheimsche Färbemethode darstellbaren Körnelungen der myeloischen Leukozyten. Über den chemischen Aufbau dieser Granula ist bisher nur bekannt, daß sie Eiweiß, Fett, Kohlehydrat, Eisen, evtl. noch Phosphor, enthalten, und daß ihnen in vivo eine dem lebenden Protoplasma ähnliche Struktur zukommt. Weiter ist die Kenntnis über den Bau der Körnelungen anderer Säugetiere, z. B. der eos. Granula des Pferdes, fortgeschritten. Diese Forschungen tragen wesentlich zum Verständnis der Oxydationsreaktionen bei, doch können die gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf menschliche Körnelungen der Blutzellen übertragen werden.

Zur Frage der Entstehung der Leukozytengranula ist wichtig, daß auf Grund der Feststellungen mehrerer Autoren das Zustandekommen von Oxy-

dasegranula durch Phagozytose exogener oxydasehaltiger Substanzen bewiesen ist. Es ist deshalb dem Oxydasegehalt der einzelnen Blutzellen wohl keine entscheidende Bedeutung beizumessen.

Trotz eingehender Untersuchungen über die Leukozytengranulation ist bis heute noch nicht festgestellt worden, welche Stoffe nun eigentlich die Oxydationsreaktionen bewirken, doch sind auf Grund der oben erwähnten Kenntnisse über die chemische Struktur der Körnelungen mehrere Theorien aufgestellt worden.

Über die Fermentnatur der Oxydasen und Peroxydasen in den Leukozytengranula, welche von manchen Forschern als Atmungskörper angesehen werden, ist zu sagen, daß der vollkommen einwandfreie Beweis, daß die Leukozytengranula des Menschen wirklich Träger von Oxydasen und Peroxydasen sind, bisher noch nicht geführt ist.

Von den Anhängern der Lipoidtheorie wird z. T. angenommen, daß die Körnelungen an ihrer Lipoidhülle, — die dann später den gebildeten Farbstoff adsorbiert, — ein Ferment enthalten, das die Farbstoffbildung veranlaßt; nach Ansicht anderer Autoren (Sehrt) aktiviert das Lipoid erst das Eisen als Katalysator der Farbreaktion.

Den Ionen kommt zweifellos ein Einfluß auf die Oxydase- und Peroxydasereaktion zu. Betreffs des Eisens ist zu erwähnen, daß es sicher ein unterstützender, aber nicht der einzige Faktor beim Zustandekommen der Oxydationsreaktionen ist.

Es ist nach den bisherigen Untersuchungen über den ganzen Fragekomplex, ob Ferment, Lipoid oder Eisen anzunehmen, daß am Vorgang der Indophenolblausynthese und Benzidinreaktion mehrere Körper beteiligt sind. Eine Stellungnahme für einen Körper ist zur Zeit noch nicht möglich.

Die Untersuchungen von Hoff stellten bei bestimmten Erkrankungen eine Beeinflussung des Zentralnervensystems auf das periphere Blutbild fest. Japanische Forscher nehmen einen Einfluß einzelner Hirnteile bei gewissen Infektionskrankheiten auf den Ausfall speziell der Peroxydasereaktion an. Inwieweit dies für leukämische Erkrankungen zutrifft, kann nach dem bisherigen Stand der Forschungen nicht gesagt werden.

Vergleichende Untersuchungen des Verf. über den Ausfall der Oxydase- und Peroxydasereaktion an leukämischen Blutbildern ergaben, — eine ausführlichere Beschreibung des Ergebnisses wurde auf S. 32 u. 33 gegeben —, daß die Oxydasereaktion bei den unreifen Formen der myeloischen Zellen der Peroxydasemethode leicht überlegen ist.

Der Grund für diese Tatsache konnte nicht ermittelt werden, trotzdem, wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, die Ergebnisse der Untersuchungen über alle möglichen, mit den Oxydationsreaktionen irgendwie in Beziehung stehenden Faktoren, berücksichtigt worden sind.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Grunke für die Überlassung des Themas sowie für die gegebenen Anregungen bei der Bearbeitung desselben meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

1. Abderhalden, E.: Lehrbuch der physiologischen Chemie (1931).
2. Bansie, H. W. und W. Ucko: Über Peroxydase, die Bedeutung des Substrates für das Ph-Optimum. Aus: Hoppe-Seyler, Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. 164 1927 S. 52.
3. Bering und Meyer: Experimentelle Studien über die Wirkung des Lichtes auf die Oxydationsfermente. Strahlentherapie 1. 1912. S. 411.
4. Berlucchi: s. unter Partrassi.
5. Biedermann, W. und Jernakoff: Die Salzhydrolyse der Stärke. III. Mitteilung: Hydrolyse durch anorganische Katalysatoren („künstliche Oxydasen"). Biochem. Zeitschr. Bd. 149. 1924. S. 309.
6. Bloch, Br. und S. M. Peek (New York): Der Nachweis der Oxydase in den Zellen des myeloischen Systems durch 3,4 Dioxyphenylalanin. Fol. Haematolog. Bd. 41. 1930. S. 166.
7. Calzavara: s. bei Partrassi.
8. Carminati, V.: I granuli sudanofili nei leucociti (Die sudanophilen Leukozytengranula). Haematologica (Pavia) Arch. 11. S. 349—396 (1930). Ref. Kongreßzentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzg. Bd. 59. 1930. S. 645.
9. Chodat, R.: Darstellung u. Nachweis von Oxydäsen u. Katalasen pflanzlicher u. tierischer Herkunft. Methoden ihrer Anwendung. (Aus Abderhalden: Lehrbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Fermentforschung Bd. 1. 1936.)
10. Epstein: Zentralblatt f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Abt. 1. Orig. B. 103 H. 6—8 S. 329—331. 1927.
11. Fiessinger, N. et L. Roudowska: Réaction microchimique des leucocytes avec la benzidine. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgb. Bd. 3. 1912. S. 97.
12. — La reaction microchimique des oxydases dans les Tissus humains. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 4. 1913. S. 261.
13. Fiessinger, N.: L'indice hématimétrique des peroxydases en pathologie. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 17. 1921.
14. Fiessinger, N. et P. Mathieu: La réaction des oxydases des leucocytes de l'homme. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 25. 1923. S. 358.
15. Fiessinger, N. et C. M. Laur: Les granulations oxybenzinophiles et la réaction peroxydasique des leucocytes de l'homme. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 50. 1928. S. 226.
16. Freifeld, H. und A. Ginsburg: Über die Herkunft der Oxydasesubstanzen in den Mononucleären. Arch. exper. Zellforsch. 7. S. 493.
17. Ganfini: s. bei Partrassi.

18. Gräff, S.: Die Naphtolblau-Oxydasereaktion der Gewebszellen nach Untersuchungen am unfixierten Präparat. Frankfurter Zeitschr. f. Pathol. 11. S. 358 1912.
19. — Die physikalisch-chemischen Grundlagen des „Mi-Effektes der Nadireaktion". Zentralbl. f. allg. Pathologie u. path. Anat. Bd. 32. Nr. 13. 1933. S. 337.
20. — Die mikromorphologischen Methoden der Fermentforschung im tierischen und pflanzlichen Organismus. Aus Abderhalden: Lehrbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Fermentforschung. Bd. 1. 1936.
21. Hirschfeld, H.: Erfahrungen mit der Oxydase- und Peroxydasereaktion. Medizinische Klinik Nr. 8. 1924. S. 249.
22. Hoff, F.: Über die zentralnervöse Blutregulation. Aus: Fortschritte der Neurologie, Psychiatrie u. ihre Grenzgebiete. VIII. Jahrg. 1936. S. 299.
23. — Kritik und praktische Bedeutung des Blutbildes. Aus: Ergebnisse der gesammten Medizin von Th. Brugsch. Bd. 13. S. 1.
24. Klopfer, A.: Experimentelle Untersuchungen über die W. H. Schulzesche Oxydasereaktion. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. Bd. 11. 1912. S. 467.
25. Kreibisch, C.: Zur Wirkung des ultravioletten Lichtes auf intrazelluläre Fermente.
26. Lipschitz, W.: Indikatormethoden zum Nachweis von Zelloxydationen. Aus Abderhalden: Lehrbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Fermentforschung. Bd. 1. 1936.
27. Loele, W.: Oxone der Zelle und Indophenolblaureaktion. Lubarsch und Ostertag. 1931. Bd. 24. S. 1. Ergebnisse der allg. Pathologie und pathol. Anatomie des Menschen und der Tiere.
28. Madelung: Biochem. Zeitschr. 71. 211.
29. Magri, V.: Sui rapporti tra granulazioni ossidasiche e granulazioni lipoidee. Arch. Ici. med. 58. 1934. S. 685. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. und ihre Grenzgeb. Bd. 78. 1935. S. 484.
30. Mascher, W.: Über die Satosche Peroxydasereaktion der myeloischen Leukozyten u. ihre Bedeutung f. die Neurologie. Zeitschr. f. Klin. Med. 1933. Bd. 124. S. 293.
31. Mielke, H.: Untersuchungen über die oxydativen Fermente der Leukozyten. Klin. Wochenschr. 4. Jahrgang Nr. 46. S. 2201.
32. Mommsen, H.: Die Granula der polymorphkernigen, feingekörnten Leukozyten unter normalen u. pathologischen Verhältnissen. Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 65. 1929. S. 287.
33. Moschkowski: Simultane Giemsa-Benzidinfärbung. Münch. med. Wochenschr. 1929. II. S. 1800. Münch. med. Wochenschr. 1930. I. S. 403.
34. Naegeli, O.: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. 1931.
35. Nagel, W. und W. Büngler: Über die exogene Entstehung der Monozytenoxydase beim Kaninchen. Frankf. Zeitschr. f. Path. 45. 1933. S. 403.
36. Neumann, A.: Die eos. Granulasubstanz d. Blutes und ihre Darstellung. Fol. Haematol. Bd. 32. K. 2. 1926. S. 166.
37. Neumann, A.: Über den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse über die chemische Beschaffenheit der Leukozytengranula. Folia haematol. Bd. 36. 1928. S. 95.

38. Nesterow, W. S.: Zur Frage der Lipoid- und Oxydasekörnelung in den Leukozyten des peripheren Blutes und in einigen Zellen des retikuloendothelialen Systems. Zeitschr. f. exp. Med. Bd. 72. 1930. S. 256.
39. Nikolajew, K.: Peroxydaseeigenschaften der Leukozyten. Russisch. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 50. 1928. S. 105.
40. Oppenheimer, K.: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.
41. — Die Fermente. Handwörterbuch der Naturwissenschaften.
42. Partrassi, G.: Literaturbericht aus den italienischen Zeitschriften mit Ausnahme der Haematologica. (Pavia) für das Jahr 1932. Folia haemathol. Bd. 51. 1933. S. 492. Es werden dort referiert:
43. Berlucchi, C.: Das striäre Blutsyndrom von Sato und Yoshimatsu. Riv. Pat. nerv. 40. 1932. S. 32.
44. Calzavara, G.: Das Atmungsferment der myeloischen Leukozyten bei den Nervenkrankheiten. Riv. Pat. nerv. 40. 1932. S. 492.
45. Ganfini, S.: Die Peroxydasereaktion bei den postenzephalischen Symptomenkomplexen u. bei Chorea. Riv. sper. Freniatr. 56. 1932. S. 931.
46. Pincussen, L.: Fermente und Licht. Biochem. Zeitschr. 241. 1931. S. 384.
47. Popper, M.: Contribution à l'étude des ferments oxydants dans les leucocytes. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. Bd. 25 S. 454.
48. Richter, M. N.: Leukemia. The relative values of cell morphologig and the peroxydase reaction as diagnostic aids. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 41. 1926. S. 151.
49. Sato, A. and Sh. Yoshimatsu: The peroxydase reaction in epidemic encephalitis. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 41. 1926. S. 362.
50. Sato, A. and S. Sekiya: A simple method for differentiation of myeloic and lymphatic leucocytes of the human blood. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 45. 1927. S. 243.
51. Schilling, V.: Das Blutbild und seine klinische Verwertung.
52. Sato, A. and K. Tokué: The strial blood picture; its pathological, experimental and physiological occarence. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 60. 1931. S. 541.
53. Satorius, F.: Die Bedeutung der Peroxydasereaktion für die Erkennung der extrapyramidalen Störungen. Monatsschr. Kinderheilk. Bd. 50. S. 309. 1931.
54. Schlenner, F.: Über Technik der Oxydasereaktion und ihr Verhalten an Monozyten. Dtsch. med. Wochenschr. Jahrgg. 47. Nr. 1 S. 6. 1921.
55. Schultze, W. H.: Die Sauerstofforte der Zelle. Verhandl. d. Dtsch. pathol. Ges. 16. Tag. Marburg 1913. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 8. 1913/14. S. 481.
56. Sereni, E.: Untersuchungen über Oxydasen. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 39. S. 845.
57. Sehrt, E.: Histologie und Chemie der Lipoide der weißen Blutzellen und ihre Beziehung zur Oxydasereaktion. Leipzig: Georg Thieme 1927.
58. — Zur Physiologie der Zellatmung und ihrer Beziehung zu neuen histologischen Befunden. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 55. 1930. S. 721.

59. Shoyi, K.: Differentiation of the peroxydase and the oxidase reaction by means of the „strial blood picture". Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 51. 1928. S. 328.

60. Simmel, H.: Über das striäre Blutsyndrom bei einem Fall von schwerer Chorea minor. Münch. med. Wochenschr. 1931. S. 660.

61. Solarino, G.: Contributo temico alla denicostrazione istochimica delle granulazioni perossidasiche e distribuzione di esse nei leucociti. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 77. 1934. S. 617.

62. Staemmler, M.: Oxydasereaktion und Zellstoffwechsel. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 264. H. 3. S. 618. 1927.

63. Stockinger, W.: Zellbilder und Zellformen des Blutes. Zeitschr. f. exp. Med. 70. 1930. S. 599.

64. Suzuki, K. and T. Arakowa: „Aperoxidatic" milk as a possibly early symptom of avitaminosis-B. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 61. 1931. S. 552.

65. Unna, P. und Golodetz, L.: Über Peroxydase und Katalase innerhalb der Zelle. Berl. klin. Wochenschr. 49. Nr. 24. 1912. S. 1134.

66. Vernon, H. M.: Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden. Biochem. Zeitschr. 47. 1912. S. 374.

67. — Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden. Biochem. Zeitschr. 60. 1914. S. 202.

68. Wallbach, G.: Untersuchungen über eine Entstehung der Oxydasegranulation. Folia haematol. Bd. 43. 1930. S. 121.

69. Wetter, A.: Über den Einfluß des ultravioletten Lichtes u. der Wärme auf die Oxydasekörnchen in Leukozyten. Ref. Kongr. Zentralbl. f. d. ges. in. Med. u. ihre Grenzgeb. Bd. 39. 1924. S. 869.

Lebenslauf.

Am 12. Juni 1913 wurde ich, Martin Bösel, in Halle a. S. als Sohn des Volksschullehrers Max Bösel und seiner Ehefrau Else geb. Grabe geboren. Ich besuchte zunächst 4 Jahre lang die hallische „Alte Volksschule" und trat dann Ostern 1923 in die Sexta des Reform-Realgymnasiums meiner Geburtsstadt ein. Mit dem Zeugnis der Reife verließ ich im Februar 1932 diese Anstalt und begann mein medizinisches Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Im Sommer 1938 bestand ich hier die ärztliche Hauptprüfung. Zur Zeit bin ich als Medizinalpraktikant am St. Barbarakrankenhaus in Halle a. S. tätig.

Druck: Carl Nieft, Spezialwerkstätten für wissenschaftliche Arbeiten, Bleicherode a. H.